



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA PRESENÇA DE *COXIELLA*
BURNETII EM EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA

RODRIGO EVANGELHO RODRIGUES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes

ORIENTADOR

Dr. João Fernandes Fagundes

da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias

Bexiga

2019

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA PRESENÇA DE *COXIELLA*
BURNETII EM EXPLORAÇÕES LEITEIRAS DA ILHA TERCEIRA

RODRIGO EVANGELHO RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Virgílio da Silva Almeida

Doutor José Ricardo Dias Bexiga

Mestre Telmo Renato Landeiro Raposo Pina Nunes

ORIENTADOR

Dr. João Fernandes Fagundes

da Silva

CO-ORIENTADOR

Doutor José Ricardo Dias

Bexiga

2019

LISBOA

Agradecimentos

Desde já agradeço ao meu Pai, por todo o sacrifício, e à minha Mãe pelo apoio incondicional, sem os quais não seria possível concretizar este meu objetivo.

À minha irmã e à minha avó Conceição que sempre me apoiaram ao longo deste trajeto.

Ao Dr. Ricardo Bexiga pela enorme disponibilidade que sempre manifestou e por todos os conselhos, correções e ensinamentos que me proporcionou ao longo da minha aprendizagem.

Ao meu orientador Dr. João Fagundes, excelente profissional e pessoa admirável, pela partilha dos seus inúmeros conhecimentos na área de grandes animais e pela sua imprescindível ajuda não só na elaboração desta dissertação, mas também ao longo de todo o meu percurso académico. Muito obrigado!

Ao Dr. Pedro Lima por tudo o que me ensinou nomeadamente na área da reprodução, fazendo-me evoluir e adquirir um gosto especial por esta área. Um muito obrigado por toda a simpatia, dedicação e sentido de humor que fizeram o meu estágio passar a correr.

Ao professor Telmo Nunes por toda a ajuda no tratamento dos dados.

Ao Dr. José Maria Cardoso e à Dra. Inês Prata por toda a disponibilidade e auxílio na elaboração desta dissertação.

Ao Eng. Marco Barros por todo o auxílio na questão laboratorial.

A toda a equipa da Unicol por todos os ensinamentos que me transmitiram ao longo destes 6 anos.

À minha namorada que desde o início foi o meu pilar, tanto a nível pessoal como académico, e que deste modo tornou este curso um bocadinho mais fácil. Um muito obrigado!

Ao Tiago Diniz pelos momentos de descontração que me deram o fôlego necessário para ultrapassar as inúmeras épocas de exames, bem como à Sra. Teresa que sempre se mostrou disponível para o que fosse necessário.

Aos meus colegas Açorianos, aos Continentais que adquiriram uma costela Açoriana durante este percurso académico e à Catarina Silva um muito obrigado por todos os momentos de estudo e diversão que facilitaram e de que maneira a minha vida académica.

A toda a minha família e amigos obrigado por estarem sempre presentes ao longo do meu percurso e em todos os momentos.

A todos os produtores com os quais tive a oportunidade de falar, pela disponibilidade que mostraram em disponibilizarem os dados da exploração, que tão importantes e valiosos foram para a realização deste trabalho.

Por fim, mas não menos importante, quero agradecer à CEVA Portugal pela iniciativa e por todo o apoio prestado no decorrer deste trabalho, sem a qual não teria sido possível realizá-lo.

Resumo

Prevalência e fatores de risco para presença de *Coxiella burnetii* em explorações leiteiras da ilha Terceira.

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de anticorpos contra a *Coxiella burnetii* em bovinos de explorações leiteiras da ilha Terceira e investigar os fatores de risco que contribuem para a infeção e disseminação da febre Q no rebanho. As amostras de leite de tanque (BTM) foram obtidas, a partir de 132 explorações leiteiras selecionadas aleatoriamente e analisadas utilizando um *kit* ELISA. A prevalência aparente foi de 75,8 % (IC 95%: 67,8-82,3). A proporção de rebanhos negativos e duvidosos foi de 18,2 % (12,5-25,6%) e 6% (3,1-11,5%), respetivamente. Os resultados demonstraram uma distribuição uniforme dos casos positivos pelos dois concelhos da ilha Terceira. Na análise univariada, três fatores foram identificados por apresentarem uma associação significativa com a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* em BTM, nomeadamente o tamanho do rebanho (> 50 animais), o contacto dos animais com bovinos de outras explorações e a convivência direta dos animais com cães ou gatos dentro da exploração. Pelo que sabemos, este é o primeiro estudo a relatar a infeção por *C. burnetii* em bovinos leiteiros na Região Autónoma dos Açores, mostrando que a febre Q é bastante prevalente na ilha Terceira.

Palavras-chave: Febre Q; *Coxiella burnetii*; Bovinos leiteiros; Prevalência; BTM; ELISA; Fatores de risco; Ilha Terceira.

Abstract

Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* in Terceira Island dairy cattle herds.

The main goal of this study was to determine the prevalence of antibodies against *Coxiella burnetii* in cattle from dairy farms in Terceira Island and investigate the risk factors which contribute to the infection and dissemination of Q fever in the herd. Bulk tank milk (BTM) samples were obtained from 132 randomly selected dairy farms and analyzed using an ELISA kit. The apparent prevalence was of 75,8% (IC 95%: 67,8-82,3). The proportion of negative and inconclusive herds was of 18,2% (12,5-25,6%) and 6% (3,1-11,5%) respectively. The results demonstrated a uniform distribution of positive cases in both counties of Terceira Island. In the univariate analyses, three factors were identified as presenting a significant association with the presence of anti-*C. burnetii* antibodies in BTM, namely the size of the herd (>50 animals), the contact of the animals with bovines from other farms and the direct interaction of the animals with dogs or cats within the farm. As much as we know, this is the first study reporting the infection by *C. burnetii* in dairy cattle in Região Autónoma of the Azores, showing that Q fever is quite prevalent in Terceira Island.

Key words: Q fever; *Coxiella burnetii*; Dairy cattle; Prevalence; BTM; ELISA; Risk factors; Terceira Island.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	iv
Índice Geral.....	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Gráficos	vii
Índice de Tabelas.....	vii
Lista de símbolos e abreviaturas	ix
1-Relatório de estágio.....	1
3-Revisão Bibliográfica.....	4
3.1- Caracterização do agente etiológico	4
3.1.1-Taxonomia.....	4
3.1.2- Ciclo de vida.....	5
3.2- Epidemiologia	7
3.2.1-Reservatórios	7
3.2.2-Modos de Transmissão	7
3.2.3-Fatores de Risco	9
3.2.4- Prevalência da Febre Q nos Animais.....	10
3.2.5- Febre Q em Humanos	11
3.3- Manifestações Clínicas nos Ruminantes Domésticos	13
3.4-Diagnósticos Diferenciais	14
3.5-Métodos de Diagnóstico	16
3.5.1- Métodos de Diagnóstico Diretos	16
3.5.2-Métodos de Diagnóstico Indiretos.....	17
3.6- Tratamento e Profilaxia	18
3.6.1- Terapêutica e Prevenção	18
3.6.2- Vacinação.....	18
4- Objetivos.....	21
5- Material e Métodos	21
5.1-Estudo Seroepidemiológico	21
5.1.1- Caracterização da área em estudo e informações gerais das explorações sujeitas a análise	21

5.1.2- Seleção do número de explorações.....	22
5.1.3- Preparação e recolha das amostras	24
5.1.4- Recolha de dados relativos às explorações	24
5.2- Técnica Laboratorial.....	25
5.2.1-Princípios e descrição da técnica.....	25
5.2.2- Execução do teste	26
5.2.3- Validação, cálculo e interpretação dos resultados	26
5.3 – Análise estatística	27
6- Resultados.....	28
6.1-Estudo 1- Rastreio Seroepidemiológico	28
6.2- Estudo 2- Fatores de risco associados à infeção por <i>C. burnetii</i>	32
7-Discussão	36
9-Limitações e Sugestões	40
8-Conclusão	41
10-Referências Bibliográficas.....	42
11-Anexos.....	48
Anexo 1- Questionário.....	48

Índice de Figuras

Figura 1: Ciclo de multiplicação da <i>C.burnetii</i> numa célula eucariótica.	6
Figura 2: Vacas em regime de pastoreio (fotografia original).....	21
Figura 3: Máquina de ordenha móvel (fotografia original).....	21
Figura 4: Posto de Recolha de leite da Vinha Brava (fotografia original).	23
Figura 5: Mapa referente à distribuição das explorações analisadas por freguesia na ilha Terceira.	31

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Percentagem dos resultados serológicos distribuídos por local de recolha de leite	32
Gráfico 2: Distribuição das explorações positivas e negativas em função do Médico Veterinário assistente	33

Índice de Tabelas

Tabela 1: Casos clínicos menos comuns abordados ao longo do estágio curricular....	2
Tabela 2: Seroprevalencia da febre Q em bovinos obtida em alguns países da Europa.	11
Tabela 3: Número de explorações leiteiras da ilha terceira por local de recolha de leite	22
Tabela 4: Número de explorações selecionadas por local de recolha de leite	24
Tabela 5: Classificação dos resultados das amostras de leite de tanque (BTM) para o teste ELISA.....	27
Tabela 6: Classificação das explorações testadas para <i>C. burnetii</i>	28
Tabela 7: Distribuição dos resultados dos testes ELISA por posto de recolha de leite e por conselho.	29
Tabela 8: Distribuição dos resultados por local de recolha de leite (em %)	30
Tabela 9: Distribuição dos resultados serológicos em função do tamanho da exploração	32
Tabela 10: Distribuição dos resultados serológicos considerando a densidade da exploração	33
Tabela 11: Distribuição dos resultados serológicos considerando a aquisição/compra de novos animais	34

Tabela 12: Distribuição dos resultados serológicos em função do contacto das explorações analisadas com ovelhas/cabras; cães/gatos; bovinos de outras explorações e pilhas de estrume.	34
Tabela 13: Distribuição dos resultados serológicos em função do método de abeberamento das explorações testadas.....	35

Lista de símbolos e abreviaturas

+ Positivo

- Negativo

± Duvidoso

%-Percentagem

°C- Graus Celsius

®- Sinal de registado

μl- Microlitro

μm-Micrómetro

BTM- Leite de tanque

CFT- Complement fixation test

C.burnetii- *Coxiella burnetii*

d- Margem de erro

DO- Densidade ótica

DOamostra- Densidade ótica da amostra

DOneg- Densidade ótica do controlo negativo

DO-Densidade ótica do controlo positivo

ELISA- Enzyme-Linked- Immunosorbent Assay

IAMA- Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas

IFA- Indirect Immunofluorescent Antibody

LCV -Large Cell Variants

n' - Número mínimo da amostra corrigido

N- Dimensão da população

nm- Nanómetro

PCR- Polimerase Chain Reaction

P- Prevalência esperada

RAA- Região Autónoma dos Açores

SCV -Small Cell Variants

SDC -Small Dense Cells

SIDA-Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

SINAVE -Sistema Nacional de Informação Epidemiológica

Th-1- Thelper 1

Unicol- União das cooperativas de lacticínios terceirense

Z- Valor *Student t* para um nível de confiança de 95%

1-Relatório de estágio

O estágio curricular do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária foi dividido em duas partes, a primeira parte decorreu em Portugal Continental, tendo início no dia 11 de setembro e término a 19 de dezembro de 2017, onde acompanhei diariamente o Dr. Pedro Lima e a segunda realizou-se na ilha Terceira durante os meses de janeiro e fevereiro de 2018, sob a orientação do Dr. João Fagundes.

Durante a primeira parte do estágio foi possível obter conhecimentos teóricos e práticos em diferentes áreas da clínica de bovinos e de sanidade animal, com destaque particular para a reprodução. A rotina diária traduzia-se no manejo reprodutivo de explorações de bovinos leiteiros através de visitas programadas. Durante estas visitas o controlo reprodutivo consistia no exame por palpação e ecografia transretal para diagnóstico precoce de gestação, confirmação da gestação, reconfirmação na pré-secagem e deteção de vacas-problema, nas quais era posteriormente instituída a terapêutica adequada. Também eram palpadadas as vacas pós-parto de modo a verificar o estado da involução uterina. No final das visitas era bastante frequente a apresentação de alguns casos clínicos por parte dos produtores. Os dias em que não haviam visitas reprodutivas eram aproveitados para fazer sanidade animal no concelho de Torres Novas, onde eram realizados testes de tuberculina em bovinos, recolhas de sangue para diagnóstico de brucelose em bovinos, ovinos e caprinos e a desparasitação dos animais, caso necessário. Para além disso foram realizados exames andrológicos em machos reprodutores tanto em explorações leiteiras como de carne, onde a recolha de sémen era feita por electroejaculação, para aprovação dos machos como reprodutores e pesquisa de *Campylobacter* sp.

Durante janeiro e fevereiro de 2018, na ilha Terceira, foi possível acompanhar o Dr. João Fagundes no seu trabalho diário. Também estava agendado o controlo reprodutivo de algumas explorações bem como a vacinação e desparasitação de vitelos em determinados produtores, no entanto, a atividade diária baseava-se sobretudo na área da clínica médica e cirúrgica em resposta às chamadas efetuadas pelos produtores. As inúmeras chamadas, bem como a diversidade dos casos apresentados foram uma ferramenta essencial na obtenção e consolidação de conhecimentos teórico-práticos. Foi durante este período e na ida às explorações que foram coletados os dados aos produtores utilizados na presente dissertação.

Ao longo de todo o estágio curricular as afeções incidiram principalmente sobre os aparelhos digestivo, respiratório e reprodutivo. A tabela abaixo apresentada ilustra os casos clínicos menos comuns encontrados ao longo do estágio curricular.

Tabela 1: Casos clínicos menos comuns abordados ao longo do estágio curricular.

*Bovinos (B) *Caprinos (C) *Ovinos (O)

Casos Clínicos	Nº de casos
Hipocalcemia (B)	19
Deslocamento abomasal à esquerda (B)	9
Parto (B)	9
Cesariana (B)	8
Recolha do tronco cerebral (B)	7
Hérnia umbilical (B)	4
Parto (C)	2
Parto (O)	2
Cesariana (C)	2
Carcinoma da terceira pálpebra (B)	2
Sutura do teto (B)	2
Necropsia (B)	2
Prolapso vaginal (C)	2
Glossoplastia (B)	1
Úlcera abomasal (B)	1
Amputação do teto (B)	1
Enucleação (B)	1
Deslocamento abomasal à direita (B)	1
Timpanismo espumoso (B)	1
Intoxicação por <i>Oxalis stricta</i> (erva-azeda) (B)	1
Reação anafiláctica por picada de abelha (B)	1
Úlcera da sola (B)	1
Abcesso da sola (B)	1
Laminite com dermatite interdigital (B)	1
Prolapso uterino (B)	1
Prolapso vaginal (B)	1
Prolapso retal (C)	1

2-Introdução

A febre Q é uma zoonose bacteriana, com distribuição mundial, que apresenta como agente etiológico *Coxiella burnetii* (Woldehiwet, 2004). Trata-se de uma doença endémica em Portugal com notificação obrigatória desde 1999, no que diz respeito aos casos humanos (Palmela *et al.*, 2012).

Prescott *et al* (2004) demonstrou que os grupos de maior risco são os trabalhadores de matadouros, agricultores e veterinários que quando afetados pela doença podem desenvolver uma infeção primária que regride espontaneamente ou em casos mais graves desenvolver um quadro crónico da doença onde as endocardites e as pneumonias atípicas são a manifestação clínica mais graves e frequentes. (Maurin & Raoult, 1999) Segundo Babudieri (1959) os ruminantes domésticos são os principais reservatórios da doença e a principal forma de contaminação humana (citado por Maurin & Raoult, 1999). A principal forma de infeção, tanto para humanos como para os animais é a inalação de aerossóis contaminados com *C. burnetii* (Tissot-Dupont *et al.*, 1999).

Nos ruminantes, principalmente nos bovinos, grande parte das infeções são assintomáticas, salvo alguns distúrbios reprodutivos, passando facilmente despercebidas aos produtores e veterinários (Núncio & Alves, 2014).

Devido à inespecificidade das manifestações clínicas o seu diagnóstico depende particularmente da familiarização do médico para com a doença em questão, e para além disso, um diagnóstico definitivo, só poderá ser alcançado por meio de testes laboratoriais (Fournier *et al.*, 1998). Guatteo *et al.* (2007) referiu no seu estudo que o leite de tanque (BTM), por ser coletado com facilidade e a baixo custo, é a melhor ferramenta para avaliação do nível de excreção de *C. burnetii* de um rebanho (citado por Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2014). Atualmente a deteção direta e quantificação por PCR e ELISA serológico devem ser considerados como métodos de escolha para o diagnóstico clínico (OIE, 2018).

Fatores associados ao aumento do risco de infeções por febre Q são local e regionalmente específicos, impondo a necessidade de avaliações regionais da disseminação da febre Q (Boroduske *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, tem surgido um maior interesse pela febre Q em Portugal, nomeadamente nos ruminantes domésticos, o que levou à realização de alguns estudos sobre a prevalência de doença nestes animais, de norte a sul de Portugal continental (Pimenta *et al.*, 2015; Anastacio *et al.*, 2016; Lampreia, 2010; Maia, 2017). No entanto, ainda não existe nenhum estudo na Região Autónoma dos Açores com o intuito de

determinar a prevalência de *C. burnetii* em ruminantes domésticos. Por esta razão, este trabalho teve como objetivo determinar a prevalência de *C. burnetii* em explorações de bovinos leiteiros na ilha Terceira, bem como os fatores de risco adjacentes.

3-Revisão Bibliográfica

3.1- Caracterização do agente etiológico

3.1.1-Taxonomia

Coxiella burnetii é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória, de pequenas dimensões (0,2 a 0,4 µm de largura, 0,4 a 1 µm de comprimento) que completa o seu ciclo no interior dos fagolisossomas das células infetadas (Maurin & Raoult, 1999; Santos *et al.*, 2007).

As primeiras referências à febre Q surgiram em 1935, quando Edward Holbrook Derrick foi convidado a investigar o aparecimento de uma doença febril que afetava os trabalhadores do matadouro público de Cannon Hill, em Brisbane, Austrália. Em resultado da sua etiologia incerta, observada em todos os casos estudados, esta doença adquiriu a denominação de *Query fever*. A doença rapidamente adquiriu um estatuto mundial (Derrick., 1937 citado por Santos *et al.*, 2007).

Dois anos após o surto descrito, a etiologia foi descoberta por Burnet e Freeman, através da administração de sangue e urina, dos pacientes afetados, em cobaias (Burnet e Freeman, 1938 citado por Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Posteriormente, foram recolhidas células do baço destes animais, e observaram-se organismos gram-negativos intracelulares morfologicamente semelhantes a *Rickettsia* sp. (Chmielewski & Tylewska-Wierzbanska, 2012). Em 1938, Cox desenvolveu um método de cultura que permitiu isolar e posteriormente investigar as estirpes bacterianas (Cox, 1941).

Por apresentar algumas características morfológicas e ecológicas semelhantes às rickettsias, inicialmente foi classificada na ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, tribo Rickettsiae (Núncio & Alves, 2014). Todavia, em 1938, Cornelius B. Philip propôs criar um novo género designado *Coxiella* e renomeou o agente etiológico como uma nova espécie *Coxiella burnetii*, em homenagem aos descobridores - Cox e Burnet (Maurin & Raoult, 1999). Actualmente *C. burnetii* é a única espécie descrita no género *Coxiella* pertencendo à ordem *Legionellale*, família *Coxiellaceae* com *Rickettsiella* e *Aquicella* (Seshadri *et al.*, 2003 citado por Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

3.1.2- Ciclo de vida

Coxiella burnetii exibe um ciclo intracelular complexo, no qual os macrófagos e os monócitos são as células preferidas (Raoult *et al.*, 2005), levando, posteriormente, à formação de estruturas semelhantes a esporos (Guatteo, 2013).

Investigações com base na microscopia eletrônica permitiram a identificação de bactérias, nas células hospedeiras, bem como a sua classificação em três grupos: “large cell variants” (LCV), “small-cell variants” (SCV) e “small dense cells” (SDC). As três formas são morfológica e metabolicamente diferentes, e também apresentam diferenças na sua resistência física e química (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). As SDC e as SCV representam as pequenas variantes morfológicas das bactérias, são metabolicamente inativas e muito resistentes a agentes químicos e físicos, como o calor, radiação UV, dessecação e pressão osmótica, o que favorece a sua persistência e transmissão no meio ambiente (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; OIE, 2018). Para além disso, as SDC podem ser consideradas pseudo-esporos (Guatteo, 2013). Pelo contrário, as LCV são metabolicamente ativas e correspondem à forma intracelular do organismo (Oyston & Davies, 2011), não intervêm na transmissão entre indivíduos, mas sim na disseminação da bactéria no organismo (Guatteo, 2013). A formação das diferentes variantes está ligada ao ciclo de vida de *C. burnetii*, uma estratégia desenvolvida para sobreviver dentro e fora do vacúolo parasitóforo.

A passagem da SCV para LCV na célula hospedeira está bem documentada, no entanto a formação da SCV e da SDC ainda não foi devidamente estudada (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). As SCV ou os pseudo-esporos ligam-se à membrana celular eucariótica, penetrando nas células por fagocitose passiva. No interior da célula residem num endossoma, onde ocorre a acidificação do meio (pH 5,5). O pH baixo parece desencadear a conversão das SCV ou dos pseudo-esporos a LCV. Após a formação da LCV ocorre a fusão do endossoma com um lisossoma, formando-se um fagolisossoma. Posteriormente, ocorre nova acidificação do meio (pH 4,5) e as LCV diferenciam-se novamente em SCV ou endosporos. Por fim sucede-se a libertação dos esporos e das SCV para o meio extracelular (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005; Guatteo, 2013).

Outra característica essencial de *C. burnetii* são as suas duas formas antigénicas: a fase I patogénica, encontrada em animais infetados, artrópodes ou humanos e a fase II atenuada, obtida apenas em laboratórios após passagens em série de culturas de células ou culturas de ovos embrionados (Maurin & Raoult, 1999; OIE, 2018). Por um lado, as bactérias na fase I penetram na célula por fagocitose passiva, no qual quase todas as

bactérias sobrevivem (Heinzen *et al.*, 1999 citado por Guatteo, 2013). Por outro lado, as bactérias na fase II (avirulentas) são rapidamente eliminadas pelos monócitos e macrófagos através de fagolisossomas (Raoult *et al.*, 2005 citado por Guatteo, 2013). Após a penetração, *C. burnetii* multiplica-se nos monócitos que circulam na corrente sanguínea e macrófagos localizados nos tecidos (Guatteo, 2013).

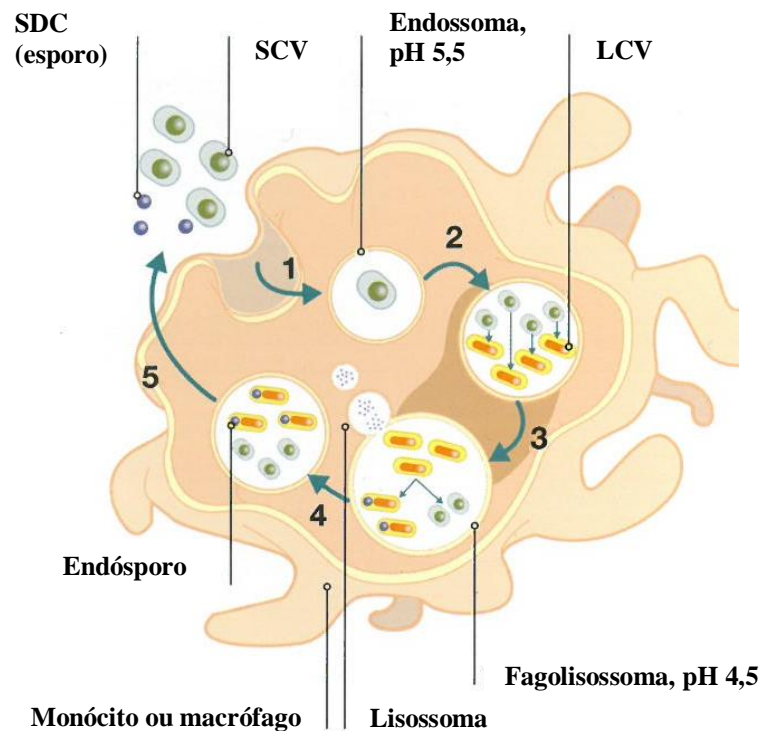


Figura 1: Ciclo de multiplicação da *C. burnetii* numa célula eucariótica.

- 1- Entrada do esporo ou SCV na célula eucariótica e acidificação do endossoma.
- 2- Multiplicação da SVC por divisão binária e diferenciação em LCV.
- 3- Fusão do endossoma com o lisossoma e acidificação do fagolisossoma.
- 4- Multiplicação do LCV por divisão binária, diferenciação LCV em SCV e desenvolvimento do endósporo.
- 5- Liberação do endósporo e SCV para o exterior da célula.

(Adaptado de Guatteo, 2013)

3.2- Epidemiologia

3.2.1-Reservatórios

A febre Q é uma zoonose com distribuição mundial. O número de reservatórios é grande e inclui muitos mamíferos silvestres e domésticos, aves e artrópodes, tendo sido detetada em praticamente todos o reino animal (Babudieri, 1959 citado por Maurin & Raoult, 1999). No entanto, segundo Marrie (1990) os ruminantes domésticos são considerados os mais comuns e os principais reservatórios a partir dos quais ocorre a contaminação humana (Marrie, 1990 citado por Maurin & Raoult, 1999).

Relativamente aos artrópodes, mais de 40 espécies de carraças são naturalmente infectadas com *C. burnetii*, incluindo *Rhipicephalus sanguineus*, parasita comum dos cães (Mantovani e Benazzi, 1953), *Haemaphysalis humerosa* encontrado no bandicoot marsupial (Smith & Derrick, 1940), *Amblyomma triguttatum* encontrado em cangurus (Pope & Dweyer, 1960) e muitas outras coletadas em diferentes partes dos Estados Unidos. Entre estas *Dermacentor occidentalis*, *Amblyomma americanum*, *Haemaphysalis leporis-palustris*, *Ixodes dentatus* e *Otobius magnini* (Cox, 1938; Davis, 1939; Cox, 1940) (Cox, 1938; Davis, 1939; Cox, 1940; Smith & Derrick, 1940; Mantovani & Benazzi, 1953; Pope & Dweyer, 1960 citado por Maurin & Raoult, 1999). Babudieri (1959) relatou a presença de *C. burnetii*, embora com menor frequência, noutros mamíferos nomeadamente cavalos, coelhos, suínos, camelos, búfalos e ratos (citado por Maurin & Raoult, 1999). Segundo Webster *et al.* (1995) os ratos selvagens podem representar um importante reservatório de *C. burnetii*, através dos quais animais domésticos, especialmente gatos, que são predadores naturais desses animais, podem ficar infetados (Webster *et al.*, 1995 citado por Angelakis & Raoult, 2010). Em conjunto com os gatos, os cães representam um importante reservatório da doença (Angelakis & Raoult, 2010).

As aves também podem estar infetadas, uma vez *C. burnetii* foi isolada de pombos, galinhas, patos, gansos e perus (Babudieri, 1959 citado por Maurin & Raoult, 1999).

3.2.2-Modos de Transmissão

Segundo Tissot-Dupont *et al.* (1999) a principal forma de infeção por *C. burnetii* é inalação de aerossóis contaminados por microrganismo a partir de animais infetados (Tissot-Dupont *et al.*, 1999). A contaminação dos aerossóis provém principalmente dos produtos do parto, mas também do leite, urina e fezes, dos mamíferos infetados (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). *Coxiella burnetti* é muito resistente no meio

ambiente, pode sobreviver durante semanas em áreas onde os animais estejam presentes, e é facilmente transportada pelo ar, o que facilita a sua dispersão (Tissot-Dupont *et al.*, 1999).

A ingestão de comida contaminada com produtos do parto é outra das formas de contaminação. O consumo de placentas infetadas tem sido considerado uma importante via de infeção. Por outro lado, o risco associado ao consumo de leite contaminado, por vitelos, ainda não foi estudado (Guatteo, 2013). O único estudo deste género, foi realizado em humanos por Anses (2010), e concluiu que tal risco não existe ou está bastante negligenciado (citado por Guatteo, 2013).

Outra importante via de infeção é a via transcutânea, através da picada de carraças (Maurin & Raoult, 1999; Guatteo, 2013). Em muitos animais, ocorre uma bacterémia transitória, precocemente, após a infeção. Durante este período, as carraças têm a oportunidade de se infetar enquanto se alimentam. Mantém-se infetadas durante todo o seu desenvolvimento e ainda conseguem transmitir o agente à sua descendência. Estes artrópodes são importantes na transmissão da bactéria nos ruminantes domésticos e na manutenção do ciclo silvático. *Coxiella burnetii* multiplica-se nas células do intestino médio ou do estômago das carraças infetadas, levando à eliminação de cargas pesadas de *C. burnetii* nas suas fezes (Maurin & Raoult, 1999), que podem ir até 1010 Coxiellae por grama (Hubálek & Rudolf, 2011), sendo que na maioria das vezes, a transmissão ocorre por inalação ou por penetração das mesmas, através de soluções de descontinuidade na pele (Blanco *et al.*, 2004 citado por Freitas, 2013). A transmissão entre cobaias foi conseguida por picada (Oyston & Davies, 2011), sendo este também um dos principais meios de infeção dos cães, que se podem infetar por picada, pelo consumo de placentas ou leite de ruminantes infetados e por via aerossol (Maurin & Raoult, 1999; Oyston & Davies, 2011). Para além das carraças, moscas que se alimentam de fezes, leite, carcaças ou sangue de animais infetados podem espalhar o agente mecanicamente (Hubálek & Rudolf, 2011).

A transmissão venérea é teoricamente possível, no entanto, segundo Guatteo (2013) nenhum estudo descreveu esta possibilidade em bovinos (Guatteo, 2013).

Coxiella burnetii apresenta uma grande estabilidade ambiental, o que lhe permite resistir à dessecação e à exposição solar por vários meses. Deste modo, na lã, algodão ou nos excrementos de carraças pode permanecer viável por muitos meses e no solo até 20 dias (Hubálek & Rudolf, 2011). Os trabalhos agrícolas e a distribuição de estrume

nos campos podem facilitar a disseminação ambiental, bem como o transporte de animais infetados (Enserink, 2010 citado Oyston & Davies, 2011).

3.2.3-Fatores de Risco

O controlo de doenças infecciosas na pecuária é em grande parte baseado na prevenção da introdução de microrganismos infecciosos nas populações suscetíveis. Por esta razão, a identificação de fatores de risco desempenha um papel fundamental na gestão da biossegurança das explorações (Agger *et al.*, 2013). No entanto, os fatores de risco para a presença de *C. burnetii* em rebanhos bovinos leiteiros são um tanto desconhecidos (van Engelen *et al.*, 2014).

O aumento do risco de infeções por *C. burnetii* em animais foi previamente associado a fatores relacionados com prática agrícola local bem como características climáticas e geográficas da região como, por exemplo, o vento. Assim, fatores associados principalmente ao aumento do risco de infeções por *C. burnetii* são local e regionalmente específicos, impondo a necessidade de avaliações regionais da disseminação da febre Q (Boroduske *et al.*, 2017).

O tamanho do rebanho leiteiro é visto como um dos principais fatores de risco da febre Q (Ryan *et al.*, 2011; Paul *et al.*, 2012; Agger *et al.*, 2013; van Engelen *et al.*, 2014; Anastácio *et al.*, 2016). Este encontra-se diretamente relacionado com o risco de infeção e disseminação de febre Q no rebanho, por um lado devido à maior probabilidade de introdução do agente e por outro devido à menor capacidade de eliminação do mesmo, em resultado de um maior número de animais suscetíveis (van Engelen *et al.*, 2014).

A compra de gado do exterior demonstrou aumentar significativamente o risco da infeção por *C. burnetii* em vacas leiteiras na Letónia (Boroduske *et al.*, 2017). O estudo de Agger *et al.* (2013) vai de encontro ao estudo de Boroduske *et al.* (2017), no entanto também demonstrou que a falta de quarentena dos animais comprados deve ser considerada um fator de risco da febre Q.

Segundo Cantas *et al.* (2011) e van Engelen *et al.* (2014) os bovinos leiteiros com carraças foram associados ao aumento do risco de positividade da amostra quando testados para a presença de *C. burnetii* (Cantas *et al.*, 2011; van Engelen *et al.*, 2014). Para além disso, o manejo adequado da exploração pode ajudar a impedir a introdução de *C. burnetii* no rebanho (Agger *et al.*, 2013). As precauções de higiene tomadas pelo veterinário antes de entrar no estábulo foram significativamente associadas a uma

menor incidência de *C. burnetii* em bovinos leiteiros (Paul *et al.*, 2012; Agger *et al.*, 2013) e o aumento do número de pessoas que manipulam os animais bem como o contacto dos animais com visitantes foram estabelecidos por Agger *et al.* (2013) como fatores de risco da febre Q.

3.2.4- Prevalência da Febre Q nos Animais

Guatteo *et al.* (2011) concluiu que já foram detetados animais infetados em todos os 5 continentes (África, América, Ásia, Europa, Oceânia), sendo a Nova Zelândia o único país com uma prevalência aparente de zero. (Hilbink *et al.*, 1993; Guatteo *et al.*, 2011) Na região centro de Portugal um estudo elaborado por Anastácio *et al.* em 2016 relatou uma prevalência de 45,9%, mais tarde Pimenta *et al.* em 2015, num estudo sobre a prevalência de anticorpos bovinos contra *C. burnetii* no leite de tanque, em explorações leiteiras do noroeste de Portugal, obteve uma prevalência aparente na ordem dos 61,1% e por último um rastreio serológico efetuado por Maia (2017) em 50 explorações de bovinos de leite no sul do Concelho de Barcelos mostrou uma prevalência de *C. burnetii* na ordem dos 62% (Anastácio *et al.*, 2016; Pimenta *et al.*, 2015; Maia, 2017).

Um estudo da seroprevalência da febre Q efetuado por Lampreia (2010) em bovinos de carne em regime extensivo na região do Baixo Alentejo constatou que 50% das explorações analisadas apresentaram resultados positivos ao teste ELISA (Lampreia, 2010).

Muitos dados estão disponíveis sobre a prevalência de *C. burnetii* em explorações de ruminantes por toda a Europa, a maioria destes estudos fez a pesquisa do agente em leite de tanque (BTM). Alguns destes estudos, realizados em bovinos, estão referenciados na tabela 2 (Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2014).

Tabela 2: Seroprevalência da febre Q em bovinos obtida em alguns países da Europa.

Adaptado de Szymańska-Czerwińska *et al.*, 2014

País	Teste utilizado	Seroprevalência	Referência
Holanda	ELISA	78,6%	Muskens <i>et al.</i> , 2011
	PCR	56,6%	
Bélgica	PCR	30%	Czaplicki <i>et al.</i> , 2012
Espanha	ELISA	67%	Astobiza <i>et al.</i> , 2012
	PCR	52%	
Reino Unido	PCR	69,7%	Valergakis <i>et al.</i> , 2012
Inglaterra	PCR	69,7%	Vicari <i>et al.</i> , 2013
Alemanha	ELISA	78,3%	Hildbert <i>et al.</i> , 2014

3.2.5- Febre Q em Humanos

Apesar da febre Q ser uma doença humana de declaração obrigatória (Stilwell, 2013) Raoult (2009) considera que a incidência real da infecção é sub-relatada devido à dificuldade de diagnóstico e ao elevado número de infecções assintomáticas, que só podem ser identificadas por seroconversão (Raoult, 2009 citado por Oyston & Davies, 2011). Segundo o SINAVE (Sistema Nacional de Informação Epidemiológica), que entrou em vigor na Região Autónoma dos Açores (RAA) a 1 de julho de 2014, não foram encontrados casos notificados de febre Q na RAA até ao dia 30 de novembro de 2018.

Os grupos de maior risco são os trabalhadores dos matadouros onde a doença pode ocorrer de forma epidémica, e os agricultores e veterinários no qual ocorre esporadicamente (Prescott *et al.*, 2004). A infecção primária ocorre após o contacto do indivíduo não imune com *C. burnetti* (Guatteo, 2013). Dupuis *et al.* (1985) demonstrou que o período de incubação é de duas a três semanas e após este período a infecção desenvolve-se em cerca de 60% dos indivíduos de forma assintomática e que apenas os restantes 40% apresentam sinais clínicos, evoluindo posteriormente para um quadro de febre Q aguda (citado por Guatteo, 2013). Em aproximadamente 2% das infecções, *C. burnetti* pode multiplicar-se mesmo após a resposta imune há infecção primária (Guatteo, 2013). Quando o sistema imunitário é insuficiente para controlar a infecção, desenvolve-se a forma crónica da doença (Maurin & Raoult, 1999).

3.2.5.1- Febre Q Aguda

O sinal clínico característico da febre Q aguda em humanos é a síndrome febril que, em regra, regride espontaneamente sem tratamento (Guatteo, 2013), no entanto, aproximadamente 4 a 5% dos indivíduos desenvolvem complicações que requerem tratamentos médicos (Dupuis *et al.*, 1985 citado por Guatteo, 2013).

O quadro clínico caracteriza-se normalmente por febre, cansaço, dores de cabeça e mialgias, todavia os casos mais severos são frequentemente acompanhados de hepatite e/ou pneumonia. (Guatteo, 2013; Parreira, 2008) A pneumonia atípica é uma das apresentações mais características da febre Q aguda (Angelakis & Raoult, 2010). Para além disso, a infeção de mulheres grávidas no primeiro terço da gestação, está particularmente associada a consequências negativas na gestação, tais como atrasos no desenvolvimento fetal, mortes intrauterinas, partos prematuros ou abortos (Guatteo, 2013).

3.2.5.2- Febre Q Crónica

Peackoc *et al.* (1983) demonstrou que a doença crónica normalmente instala-se no período de seis meses a um ano, no entanto, segundo Gami *et al.* (2004) a doença pode manifestar-se anos após a infeção inicial (Peackoc *et al.*, 1983 citado por Maurin & Raoult, 1999; Gami *et al.*, 2004 citado por Angelakis & Raoult, 2010). Estão especialmente associados a esta condição indivíduos com doenças cardiovasculares, grávidas e pessoas com imunodepressão, incluindo aqueles com neoplasias ou doentes com síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA) (Fenollar *et al.*, 2001 citado por Angelakis & Raoult, 2010).

A manifestação mais frequente de febre Q crónica é a endocardite, que atinge entre 60 a 70% dos casos crónicos (Maurin & Raoult, 1999). Pessoas com deficiências nas válvulas cardíacas apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de endocardites (Guatteo, 2013).

A infeção vascular é a segunda apresentação mais frequente neste estágio da doença, no entanto podem ser observadas outras manifestações clínicas tais como infeções osteoarticulares, incluindo osteomielite, osteoartrite, hepatite crónica ou um mal-estar geral caracterizado por uma fadiga crónica (Angelakis & Raoult, 2010).

3.3- Manifestações Clínicas nos Ruminantes Domésticos

Segundo Guatteo (2013) existe menor referenciação das manifestações clínicas nos ruminantes comparativamente aos humanos, no que diz respeito à febre Q (Guatteo, 2013). Nestes animais, trata-se de uma doença sub-diagnosticada, uma vez que causa infeções geralmente assintomáticas, aparentemente subclínicas, salvo alguns distúrbios reprodutivos mais ou menos ligeiros, passando quase sempre despercebidas aos produtores e veterinários (Núncio & Alves, 2014). As manifestações clínicas mais comumente observadas e relatadas pelos produtores são os distúrbios reprodutivos, entre os quais, abortos, natimortos e recém-nascidos fracos e inviáveis. As pneumonias também são um dos sinais clínicos mais frequentes da doença, sendo observadas durante a fase aguda e sendo, muitas vezes, acompanhadas por distúrbios reprodutivos (Guatteo, 2013).

A febre Q também está associada a endometrites e à retenção placentária (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005), no entanto ainda não é evidente que essa relação se deva à própria bactéria ou se o aborto, por sua vez, é que predispõe à retenção placentária que, consequentemente, predispõe à metrite (Guatteo, 2013). Para além disso, *C. burnetti* tem sido responsabilizada por induzir mastites clínicas (Barlow *et al.*, 2008) ou subclínicas (To *et al.*, 1998), em vacas de leite (citado por Guatteo, 2013). Uma das vias de excreção de *C. burnetti* é o leite (Rodolakis *et al.*, 2007), por esta razão, os estudos efetuados ainda não conseguem diferenciar a febre Q como desencadeante de mastites da simples deteção de *C. burnetti* em bovinos com alta concentração de células somáticas no leite (Guatteo, 2013).

Muitas vezes, o número reduzido de fêmeas abortadas pode não ser suficiente para alertar o produtor, pelo que nos bovinos as metrites são frequentemente a única manifestação da doença. Após o aborto, as fêmeas recuperaram rapidamente, e geralmente não abortam nas gestações seguintes, podendo por outro lado a metrite persistir por vários meses (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). A metrite e os problemas de infertilidade devido à infeção por *C. burnetii* são mais frequentes em bovinos do que em outras espécies de ruminantes (Rodolakis *et al.*, 2007).

Segundo Parisi *et al.* (2006) e Berri *et al.* (2007) os abortos causados por *C. burnetti* são mais frequentes nos ovinos e caprinos do que nos bovinos (citado por Guatteo, 2013). A Febre Q é considerada a primeira ou segunda causa infecciosa de aborto em bovinos, conjuntamente com a neosporose, em ovinos, paralelamente à toxoplasmose, e em caprinos, em conjunto com a clamidiose (Guatteo, 2013). Anteriormente a um

aborto por *C. burnetti*, que se saiba, nenhum sinal clínico pode ser observado e estes abortos aparentam ser mais frequentes no último terço da gestação (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Este último facto deve-se principalmente à maior facilidade de deteção da bactéria nas placentas de vacas abortadas no último terço da gestação e ao facto dos abortos serem mais facilmente detetados e, consequentemente, investigados durante este período (Guatteo, 2013). Abortos causados por febre Q tipicamente não se repetem em ovelhas, mas cabras podem abortar novamente em gestações subsequentes se a infeção recorrer (Van Metre, 2014). Esta informação não é aplicável para os bovinos, uma vez que as fêmeas que abortam uma vez frequentemente são refugadas pelos criadores (Guatteo, 2013).

Em suma, atualmente está devidamente referenciado o papel de *C. burnetii* nos abortos, e não está confirmado, mas é altamente suspeito, o seu papel nos distúrbios reprodutivos (infertilidade, metrites, retenção placentária) e nos casos de natimortos, principalmente no caso de partos prematuros. No entanto, pesquisas futuras serão necessárias, para determinar se *C. burnetii* está ou não envolvida nos distúrbios respiratórios e nas mastites subclínicas (Guatteo, 2013).

3.4-Diagnósticos Diferenciais

Santos (2016) defendeu num breve artigo a maior sensibilização para a ocorrência de infeções por *C. burnetii* nos animais de produção e a sua inclusão no diagnóstico diferencial da doença abortiva, de modo a prevenir a contaminação ambiental e a, consequentemente, reduzir o número de casos de infeção (Santos, 2016). Deste modo, na lista de diagnósticos diferenciais de febre Q devem incluir-se as outras causas de aborto tardio e infertilidade (Maia, 2017).

As causas do aborto podem ser amplamente divididas em não infecciosas e infecciosas. Na maioria dos casos em que um diagnóstico é alcançado, a causa é infecciosa, embora causas não infecciosas provavelmente sejam responsáveis por muitos abortos não diagnosticados. As causas dos abortos de natureza não infecciosa podem subdividir-se em físicas, nutricionais, tóxicas e genéticas (Cabell, 2007), podendo por outro lado os abortos de origem infecciosa ser provocados por bactérias, protozoários, vírus e fungos (Givens & Marley, 2008).

Relativamente aos abortos de origem infecciosa, podemos equacionar como diagnósticos diferenciais da febre Q as doenças que apresentam sinais clínicos semelhantes, principalmente o aborto tardio (Maia, 2017).

Causas Bacterianas:

- **Brucelose** - *Brucella abortus* - Aborto geralmente ocorre após os 5/6 meses de gestação, ocorrendo também, frequentemente, o nascimento de vitelos fracos, bem como o aparecimento de metrites e retenções placentárias após o aborto (Cabell, 2007; Givens & Marley, 2008).
- **Campilobacteriose** - *Campylobacter fetus venerealis*- Os abortos podem ser observados, esporadicamente, entre o 4º e o 8º mês de gestação (Cabell, 2007; Givens & Marley, 2008).
- **Listeriose** - *Listeria monocytogens* - O aborto geralmente ocorre no último trimestre da gestação. As vacas infetadas podem apresentar sinais clínicos semelhantes aos da febre Q como endometrite e retenções placentárias (Givens & Marley, 2008).
- **Clamidiose** - *Chlamydophila abortus* - A infecção de bovinos pode resultar em aborto, principalmente entre os 6 e os 8 meses de gestação, ou no nascimento de bezerros fracos (Givens & Marley, 2008).
- **Leptospirose** - *Leptospira hardjo/ Leptospira pomona* - Os abortos ocorrem no último trimestre da gestação (serovar pomona) ou a partir do quarto mês (serovar hardjo). A infertilidade encontra-se muitas das vezes associada a este último serovar (Givens & Marley, 2008).

Estas são as causas mais comuns de aborto com origem bacteriana no entanto também se podem considerar como diagnósticos diferenciais a micoplasmose, na qual o aborto ocorre normalmente entre o 6º e 9º mês de gestação e a histophilose, onde o aborto pode ocorrer em qualquer fase, no entanto está raramente associada a abortos em bovinos (Cabell, 2007; Givens & Marley, 2008).

Causas parasitárias:

Neosporose - *Neospora caninum* - Os abortos acontecem mais comumente entre os 5 e os 6 meses de gestação, mas os abortos de fim de gestação, o nascimento de vitelos fracos e o nascimento de animais seropositivos sem sinais clínicos também podem ocorrer (Givens & Marley, 2008).

Causas micóticas:

Aspergillus fumigatus - é o agente mais comum, observando-se o aborto geralmente entre 6º e os 8º meses de gestação, ocorrendo frequentemente placentites e retenções placentárias (Givens & Marley, 2008).

3.5-Métodos de Diagnóstico

Segundo Zeman *et al.* (1989) devido à reduzida especificidade dos sinais e sintomas, a febre Q não apresenta qualquer sinal clínico que possa ser considerado patognomónico, pelo que o diagnóstico só pode ser alcançado por meio de testes laboratoriais (citado por Guatteo, 2013).

Inicialmente o diagnóstico da febre Q em ruminantes foi efetuado por Lang (1990), com base na análise microscópica das amostras clínicas, juntamente com resultados serológicos positivos (citado por OIE, 2018). Mais tarde Maurin e Rault (1999) defenderam que o diagnóstico de febre Q deveria ser baseado em métodos serológicos, uma vez que as técnicas de cultura e biologia molecular tinham baixa sensibilidade e estavam disponíveis apenas em laboratórios de referência (Maurin & Raoult., 1999). Atualmente, não existe técnica de diagnóstico padrão, no entanto a deteção direta e quantificação por PCR, e ELISA serológico devem ser considerados como métodos de escolha para o diagnóstico clínico (OIE, 2018).

Existem dois tipos de métodos de diagnóstico, entre os quais os métodos diretos, que pesquisam diretamente a presença da bactéria na amostra biológica e os indiretos, que pesquisam a presença de anticorpos em circulação (Guatteo, 2013). Para a escolha assertiva de um teste de diagnóstico existem vários critérios a considerar, nomeadamente a sua especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo, custo e a quantidade de antígeno necessária (Fournier *et al.*, 1998).

3.5.1- Métodos de Diagnóstico Diretos

Os métodos de diagnóstico diretos são particularmente úteis na confirmação de uma infeção ativa por *C. burnetii*, porém, poucos laboratórios estão aptos a executá-los. Os testes diretos incluem o isolamento *in vitro* do agente, a visualização do agente por imunohistoquímica e a deteção de DNA específico por PCR (Santos *et al.*, 2007).

Arricau-Bouvery *et al.* (2005) e Kazar (2005) referiram que o isolamento bacteriológico tem pouca especificidade e sensibilidade (citado por Guatteo *et al.*, 2006), além disso o crescimento de *C. burnetii* é lento, podendo levar duas semanas ou mesmo mais tempo (Santos *et al.*, 2007). Acresce-se o facto de este teste exigir laboratórios confinados de nível 3 e não poder ser utilizado na triagem em massa (Guatteo *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007).

Muramatsu (1996), Uwatoko (1996), Berri (2000) e Öngör (2004) nos seus estudos referenciaram que o PCR convencional tornou-se um método muito útil na deteção do

DNA de *C. burnetii* em amostras biológicas de ovinos e caprinos (citado por Guatteo *et al.*, 2006). Esta técnica permite, virtualmente, o estudo de todos os tipos de amostras disponíveis (Maurin & Raoult, 1999) embora não forneça qualquer abordagem quantificável da carga bacteriológica nas amostras testadas, informação esta que é crucial para avaliar o risco de zoonose (Guatteo *et al.*, 2006).

Foi referenciado por Stein & Raoult (1992) que o PCR, inicialmente, era muito sensível e específico, no entanto encontrava-se disponível apenas em laboratórios de pesquisa especializados. A disponibilidade de *primers* derivados de genes específicos para *C. burnetii* permitiu a elaboração de um método simples e confiável na detecção deste agente, mesmo em tecidos embebidos em parafina (citado por Guatteo *et al.*, 2006). Nos dias de hoje encontram-se disponíveis *kits* de PCR para ruminantes que podem ser utilizados de forma útil e confiável para triagem em grandes grupos e vários tipos de amostras (OIE, 2018).

3.5.2-Métodos de Diagnóstico Indiretos

Os métodos indiretos incluem o teste de fixação de complemento (CFT), ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) ou o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (OIE, 2018). Estes são classicamente utilizados no diagnóstico de rotina e nos estudos epidemiológicos de larga escala para detetar portadores de anticorpos contra *C. burnetii*, no entanto demonstram apenas uma exposição prévia ao agente e não a atual excreção do mesmo (Maurin & Raoult, 1999).

Vários trabalhos publicados mostraram que a sensibilidade relativa é menor para o CFT, mas inversamente, tem alta especificidade para elevados níveis de anticorpos. A sua utilização para diagnósticos veterinários tem, no entanto, vindo a diminuir (OIE, 2018).

Kovacova *et al.* (1998) e Field *et al.* (2000) demonstraram que a IFA não é frequentemente utilizada para o diagnóstico de febre Q em animais por ser inconveniente para o rastreio em larga escala, não ser automatizada e devido à sua subjetividade (citado por Arricau-Bouverry & Rodolakis, 2005). Por estas razões, tem a desvantagem de ser menos reprodutível entre os operadores e, consequentemente, entre os laboratórios (OIE, 2018).

Field *et al.* (2000) descreveu, pela primeira vez, o teste ELISA como mais específico e sensível do que a fixação do complemento (CF) e Peter *et al.* (1988) e Cowley *et al.* (1992) demonstraram a maior sensibilidade desta técnica comparativamente à

imunofluorescência indireta (IFI), defendendo a sua aplicação no diagnóstico serológico da febre Q (citado por Fournier *et al.*, 1998). Embora os métodos ELISA não sejam totalmente validados e harmonizados, estes podem ser automatizados e são recomendados como o teste serológico rotineiro em animais. Para o diagnóstico em grupos de animais, estão comercialmente disponíveis *kits* já prontos, que podem detetar misturas de anticorpos anti-fase I e II (OIE, 2018).

No entanto, segundo Guatteo (2013), as sensibilidade e especificidade destas técnicas nunca foram avaliadas em condições de campo para ruminantes.

3.6- Tratamento e Profilaxia

3.6.1- Terapêutica e Prevenção

Atualmente, as medidas médicas consistem no uso de antibióticos e / ou vacinas para controlar a disseminação da bactéria em animais de produção. Os antibióticos, como as tetraciclina são reconhecidos por reduzir a incidência de abortos, no entanto não impedem a eliminação de *C. burnetii*, tornando muito improvável a eliminação completa do problema (Van Metre, 2014; Oyston & Davies, 2011). Para além das tetraciclina, a enrofloxacin e as sulfas-trimetropim também apresentam alguma eficácia no tratamento da febre Q (Stilwell, 2013).

Em ruminantes, o tratamento com antibióticos geralmente consiste na administração de duas injeções de oxitetraciclina (20 mg por kg de peso corporal) durante o último mês de gestação, embora, como acima mencionado, este tratamento não suprima totalmente os abortos e a eliminação de *C. burnetii* no parto (Angelakis & Raoult, 2010).

Em rebanhos onde está diagnosticada a infeção, a manutenção de animais prenhes em ambientes fechados, a separação de ruminantes ao parto, a destruição dos produtos do parto, nomeadamente das placentas, a descontaminação do material de parto e desparasitações regulares no combate às carrças são medidas que podem reduzir a transmissão do organismo entre animais e dos animais para os humanos (Angelakis & Raoult, 2010; Guatteo, 2013).

3.6.2- Vacinação

Como forma de controlo da infeção por *C. burnetii* em humanos e animais, os ruminantes podem ser vacinados usando vacinas inativadas contra *C. burnetii*. O objetivo desta vacinação é reduzir a excreção do agente e o risco de aborto (OIE, 2018).

Os primeiros ensaios de campo com uma vacina contra a febre Q bovina foram realizados por Luoto em 1952. Esses autores utilizaram células inteiras inativadas com formalina de uma estirpe de *C. burnetii* em fase II (Schmeer et al., 1987).

Até ao momento, apenas vacinas inativadas estão disponíveis contra *C. burnetii*. As vacinas inativadas que estão disponíveis no mercado são derivadas de estirpes de *C. burnetii* em estágios de fase I ou fase II. A literatura sugere que a eficácia das vacinas contra febre Q no controle da infecção varia principalmente de acordo com sua composição, especialmente a fase de *C. burnetii* utilizada (fase I, fase virulenta com LPS completo, ou fase II, fase avirulenta com LPS incompleto) (OIE, 2018). Como regra geral, as vacinas preparadas com a fase I são reconhecidas como mais protetoras do que as preparadas a partir da fase II (Guatteo et al., 2008). Para gerar uma resposta imunológica adequada, minimizando os riscos de segurança, a produção eficiente de vacinas deve ser direcionada a vacinas contendo antígenos de fase I (OIE, 2018).

Em animais, as vacinas mais eficazes são aquelas compostas de bactérias inteiras de fase I inativadas. Trabalhos recentes sobre a vacinação de animais mostraram que as vacinas permitem uma forte redução da excreção de *C. burnetii*. No entanto, para vários autores, as vacinas da fase I não conseguiram evitar a excreção no leite em vacas naturalmente infetadas antes da vacinação, ressaltando ainda que uma vacina só pode proteger animais não infetados, mas não é capaz de tratar um animal infetado (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005).

Guatteo et al. (2008) demonstraram que quando vacinada com uma vacina de fase I, enquanto não estava prenhe, um animal inicialmente não infetado tinha uma probabilidade cinco vezes menor de vir a excretar *C. burnetii* do que um animal recebendo placebo. No entanto, não havia efeito significativo da vacinação em comparação com o placebo, na diminuição da excreção bacteriana, independentemente do status inicial dos animais (Guatteo et al., 2008).

Por outro lado, concluiu que um animal vacinado durante a gravidez tinha uma probabilidade semelhante de vir a excretar o agente do que um animal onde era administrado o placebo. As alterações hormonais durante a gravidez são responsáveis por uma imunodepressão, especialmente pela inibição da resposta imune pró-inflamatória tipo T-helper1. As respostas imunológicas do tipo Th-1, como a produção de interferon gama (IFN- α), são conhecidas por serem eficazes na limitação da multiplicação de *C. burnetii*, no entanto, durante a gravidez são reguladas negativamente, facilitando a sobrevivência e multiplicação das bactérias, explicando

assim o efeito semelhante entre a vacina e o placebo quando administrados em animais prenhes (Guatteo *et al.*, 2008).

O elevado efeito protetor da vacina estudada em relação ao risco de excreção em animais suscetíveis reforça o seu valor em limitar a disseminação da bactéria dentro de um rebanho e, assim também, em limitar o risco zoonótico. Idealmente, esta vacina deve ser usada em rebanhos não infetados onde se recomenda a vacinação de pelo menos todas as novilhas antes da primeira cobrição ,e em rebanhos infetados, a vacinação de vacas leiteiras é particularmente indicada quando a seroprevalência dentro do rebanho é baixa, ou seja, em rebanhos onde a infecção ainda não se espalhou amplamente. A ausência de qualquer redução na carga de bactéria eliminada por animais infetados quando vacinados, bem como a conhecida alta resistência de *C. burnetii* no ambiente destaca a necessidade de combinar medidas higiénicas e médicas para reduzir ainda mais o fardo infeccioso dentro dos rebanhos infetados (Guatteo *et al.*, 2008).

4- Objetivos

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a prevalência de *C. burnetii* nas explorações de bovinos leiteiros da ilha Terceira. Como objetivo secundário pretendeu-se identificar associações entre o nível de anticorpos contra *C. burnetii* em amostras de BTM e os fatores de risco individuais de cada exploração.

5- Material e Métodos

5.1-Estudo Seroepidemiológico

5.1.1- Caracterização da área em estudo e informações gerais das explorações sujeitas a análise

O efetivo bovino leiteiro da ilha Terceira é composto principalmente por vacas da raça Holstein-Friesian e por alguns animais de raça Jersey. Estas são exploradas na sua grande maioria em regime de pastoreio, ao ar livre, salvo seis explorações, onde as vacas se encontram estabuladas. Algumas explorações possuem parque de alimentação, por onde passam os animais, anterior ou posteriormente à ordenha, e onde se alimentam de silagem de milho ou de erva antes de serem encaminhados para a pastagem. Na grande maioria das explorações a ordenha é feita mecanicamente, através de ordenhas móveis, e o leite é transportado em tanques móveis para o posto de recolha de leite mais próximo. No entanto, algumas explorações possuem sala de ordenha e uma sala de armazenamento do leite com tanque de refrigeração.

De acordo com a listagem fornecida pela Unicol (União das Cooperativas de Lacticínios Terceirense), em janeiro de 2018, na ilha Terceira foram identificadas um total de 544 explorações leiteiras que se encontram distribuídas pelos postos de recolha de leite da ilha Terceira. Destas 544 explorações 94 possuem tanque de leite fixo e as restantes 450 encontram-se subdivididas pelos 20 postos de recolha de leite.

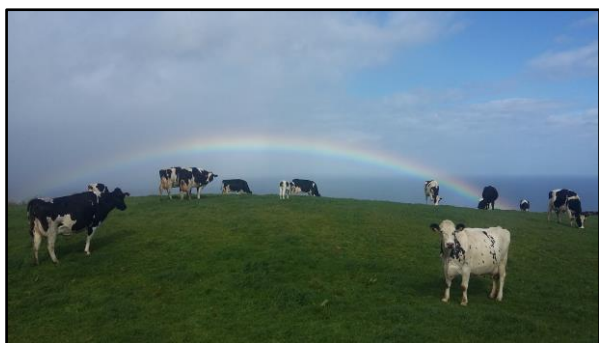


Figura 3: Vacas em regime de pastoreio (fotografia original).



Figura 2: Máquina de ordenha móvel (fotografia original).

Tabela 3: Número de explorações leiteiras da ilha terceira por local de recolha de leite

Local de Recolha de leite	Nº Explorações
Salas de ordenha	94
Posto Vinha Brava	37
Posto Feteira	31
Posto Porto Judeu	17
Posto Paul	8
Posto São Sebastião	53
Posto Fonte do Bastardo	21
Posto Canada dos Pastos	14
Posto Fontinhas	36
Posto Lajes	45
Posto Vila Nova	29
Posto Agualva	22
Posto Quatro Ribeira	7
Posto Biscoitos	11
Posto Altares	22
Posto Raminho	9
Posto Serreta	6
Posto Doze Ribeiras	21
Posto Santa Barbara	15
Posto Cinco Ribeiras	14
Posto São Bartolomeu	32
Total	544

5.1.2- Seleção do número de explorações

Das 544 explorações da ilha Terceira foram seleccionadas aleatoriamente 132. Naing *et al.* (2006) defende que o valor da prevalência esperada deve ser obtido por comparação aos valores da literatura em estudos semelhantes e caso o valor das prevalências obtidas nesses estudos se encontrar entre os 40% e os 60%, 50% dará a amostra maior pelo que deverá ser o valor escolhido. Por esta razão e visto que nos três estudos efetuados em Portugal continental por Anastacio *et al.* (2016), Pimenta *et al.* (2015) e Maia (2017) revelaram uma prevalência entre os 45,9% e os 62% a prevalência esperada utilizada neste estudo foi de 50%.

De acordo com Naing *et al.* (2006) a margem de erro (precisão) mais apropriada para estudos de prevalência deve ter em conta as limitações do estudo, nomeadamente os recursos financeiros, tempo e disponibilidade do investigador, no entanto deve-se calcular o tamanho da amostra com precisão razoável/aceitável e só depois permitir outras limitações. Posto isto, em conjunto com a CEVA, empresa que disponibilizou os *kits* ELISA para a realização do estudo, foi definido como base, o estudo de

aproximadamente 25% das explorações leiteiras da ilha Terceira, pelo que o tamanho da amostra foi calculado para um intervalo de confiança (CI) de 95% aceitando uma margem de erro de 7,5 %. O valor t de *Student* para o nível de confiança de 95% é de 1,96.

O número mínimo de explorações a analisar foi calculado a partir da fórmula abaixo apresentada (Daniel, 1999 citado por Naing *et al.*, 2006):

$$n' = \frac{NZ^2P(1 - P)}{d^2(N - 1) + Z^2P(1 - P)}$$

n'= número mínimo da amostra corrigido

N= dimensão da população (544)

Z= valor t de *Student* para um nível de confiança de 95% (1,96)

P= prevalência esperada (50%)

d= margem de erro (7,5%)

O número mínimo de amostras corrigido (n') obtido foi de aproximadamente 130 explorações. Visto que cada posto de recolha de leite engloba as explorações leiteiras daquela região e de modo a obter uma amostra homogénea das explorações leiteiras da ilha Terceira, a seleção aleatória foi feita a partir dos postos de recolha de leite e não a partir da amostra total de explorações. Selecionou-se aleatoriamente, através de um gerador de números aleatório (*randomizer.org*), aproximadamente 25% das explorações de cada posto de recolha, obtendo-se um total de 132 explorações.



Figura 4: Posto de Recolha de leite da Vinha Brava (fotografia original).

Tabela 4: Número de explorações selecionadas por local de recolha de leite

Local de Recolha de leite	Nº Explorações
Salas de ordenha	21
Posto Vinha brava	10
Posto Feteira	8
Posto Porto Judeu	4
Posto Paul	2
Posto São Sebastião	13
Posto Fonte do Bastardo	4
Posto Canada dos Pastos	3
Posto Fontinhas	9
Posto Lajes	12
Posto Vila Nova	7
Posto Agualva	5
Posto Quatro Ribeira	2
Posto Biscoitos	3
Posto Altares	5
Posto Raminho	3
Posto Serreta	1
Posto Doze Ribeiras	4
Posto Santa Barbara	4
Posto Cinco Ribeiras	4
Posto São Bartolomeu	8
Total	132

5.1.3- Preparação e recolha das amostras

A recolha das amostras de leite de tanque (BTM) foi efetuada pelos técnicos de recolha de amostras do I.A.M.A (Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas), no âmbito da classificação do leite à produção, a todas as explorações leiteiras da ilha Terceira, durante o mês de janeiro de 2018. As amostras foram entregues diretamente no laboratório do I.A.M.A e posteriormente transferidas para o Laboratório Regional de Veterinária, onde foram congeladas a -20°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), até serem processadas por ELISA por um técnico deste mesmo laboratório.

5.1.4- Recolha de dados relativos às explorações

Foi elaborado um questionário padronizado com perguntas fechadas e semiabertas, a partir do qual todos os produtores das explorações em estudo foram entrevistados. A entrevista aos produtores foi efetuada durante o estágio, entre fevereiro e março de

2018, sempre pela mesma pessoa, na visita às explorações, nos postos de recolha de leite ou pelo telefone.

As questões presentes no questionário diziam respeito à caracterização da exploração (marca da exploração; número de vacas em lactação; número total de vacas; área da exploração e localização geográfica de todas as parcelas de terreno da exploração), à saúde geral do rebanho (contagem de células somáticas (CCS)); saúde uterina; abortos; vitelos fracos ao nascimento; pneumonias pós-parto) e às rotinas de manejo da exploração (vacas em contacto com outros bovinos, cães ou gatos, ovelhas ou cabras ou pilhas de estrume; tipo de abeberamento dos animais; importação ou compra de animais) reconhecidas como importantes para a biossegurança da exploração.

5.2- Técnica Laboratorial

O teste utilizado laboratorialmente para deteção de anticorpos anti *C. burnetii* nas amostras de BTM, foi o teste ELISA, de nome comercial ID Screen® Q fever indirect multi-species ELISA (produzido pela IDVet Genetics). Este teste utiliza estirpes *C. burnetii* nas fases I e II, isoladas a partir das placentas de bovinos abortados e permite detetar anticorpos específicos anti *C. burnetii* em amostras de soro, plasma e em leite individual ou leite de tanque (BTM) de bovinos, ovinos e caprinos, conforme indicado pelo fabricante. Para um IC de 95% este teste apresenta uma sensibilidade superior a 88% e uma especificidade acima dos 95%, segundo os testes efetuados pelo fabricante.

5.2.1-Princípios e descrição da técnica

Os poços da microplaca são revestidos com antígeno inativado de células inteiras de *C. burnetii*. Amostras de soro, plasma ou leites são diluídas e posteriormente adicionadas aos poços onde reagem com os antígenos ligados ao suporte sólido. O material não ligado é removido por lavagem após um período de incubação adequado. De seguida, o conjugado reage com anticorpos específicos ligados ao antígeno e o conjugado que não reagiu é removido por lavagem após um período de incubação adequado. Adiciona-se depois o substrato enzimático. A taxa de conversão do substrato é proporcional à quantidade de anticorpos ligados. A reação termina após um tempo determinado e o grau de cor demonstrado, densidade ótica (DO), é medido espectrofotometricamente (OIE, 2018). A DO é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos específicos de *C. burnetii* presentes na amostra e o resultado obtém-se

por comparação da DO dos poços com amostra com a DO dos poços com controlo positivo (Fournier *et al.*, 1998).

5.2.2- Execução do teste

- 1-Descongelou-se as amostras de leite em banho-maria.
- 2-Centrifugou-se cada amostra de modo que a camada de gordura se separasse do soro do leite (gordura no topo, soro no fundo).
- 3-Pipetou-se abaixo da camada de gordura do leite de modo a que apenas o soro entrasse no cone (anticorpos encontram-se no soro).
- 4-Adicionou-se:
 - 90 µl de solução tampão 2 e 10 µl de controlo negativo nos poços A1 e B1.
 - 90 µl de solução tampão 2 e 10 µl de controlo positivo nos poços C1 e D1.
 - 50 µl de solução tampão 2 e 50 µl de cada amostra de leite para ser testado nos poços restantes.
- 5- Incubou-se 45min \pm 4 min a 21°C (\pm 5°C).
- 6- Esvaziou-se os poços. Lavou-se cada poço 3 vezes com aproximadamente 300 µl de solução de lavagem tendo o cuidado de evitar a secagem dos poços entre lavagens e de não deixar qualquer anel adiposo no poço após as mesmas.
- 7- Adicionou-se 100 µl de conjugado uma vez, pré diluído na concentração 1/10, em cada poço.
- 8- Incubou-se 30min \pm 3 min a 21°C (\pm 5°C).
- 9-Esvaziou-se os poços e lavou-se novamente cada poço 3 vezes com aproximadamente 300 µl de solução cumprindo as recomendações de lavagem.
- 10- Adicionou-se 100 µl de substrato em cada poço.
- 11- Incubou-se 15min \pm 2 min a 21°C (\pm 5°C) no escuro.
- 12-Adicionou-se 100 µl da solução de paragem em cada poço, a fim de parar a reação.
- 13- Leu-se os resultados após a cor ficar estável com o auxílio de um espectrofotómetro com um comprimento de onda de 450nm.

5.2.3- Validação, cálculo e interpretação dos resultados

O teste é válido se:

- o valor médio da densidade ótica do controlo positivo (DO_{pos}) for superior a 0,350;

$$\text{DO}_{\text{pos}} > 0,350$$

- o rácio entre as médias das densidades óticas dos controlos positivos e negativos (DO_{pos} e DO_{neg}) for superior a 3;

$$DO_{pos}/DO_{neg} > 3$$

O rácio que relaciona a amostra com a positividade da mesma (S/P (S/P%)) é efetuado a partir da seguinte fórmula:

$$S/P\% = \frac{DO_{amostra} - DO_{neg}}{DO_{pos} - DO_{neg}} \times 100$$

Os resultados individuais de cada amostra foram classificados em positivo, negativo ou duvidoso, de acordo com os critérios definidos pelo fabricante do teste.

Tabela 5: Classificação dos resultados das amostras de leite de tanque (BTM) para o teste ELISA

Amostras de leite de tanque (BTM)	
Resultado	Interpretação
$S/P\% \leq 30\%$	Negativo
$30\% < S/P\% \leq 40\%$	Duvidoso
$S/P\% > 40\%$	Positivo

Para efeitos de análise estatística, no estudo 2, todas as explorações acima do *cut-off* 40 foram categorizadas como positivas e as que apresentaram um *cut-off* equivalente ou inferior a este valor como negativas.

5.3 – Análise estatística

Os dados dos testes ELISA bem como os dados do questionário foram compilados e organizados no programa Microsoft Excel® 2010, também foi neste programa que foi calculada a prevalência aparente. Para o cálculo da prevalência de *C. burnetii* foi ainda utilizado o método de Wilson, com um intervalo de confiança de 95%. Posteriormente, procedeu-se ao processamento estatístico através do programa R® no qual foram realizados os testes de Qui-quadrado de Pearson para as variáveis assumidas como fatores de risco. Em todos os casos que implicam um valor p, assumiu-se um valor de $p < 0,05$ como significativo.

6- Resultados

6.1-Estudo 1- Rastreio Seroepidemiológico

Neste trabalho, o rastreio serológico em leite do tanque permitiu identificar 100 explorações positivas, 8 duvidosas e 24 negativas, demonstrando uma prevalência aparente de 75,8%. A proporção de rebanhos negativos e duvidosos foi de 18,2% e 6%, respetivamente (Tabela 6).

Tabela 6: Classificação das explorações testadas para *C. burnetii*

Exploração	Positivo	Duvidoso	Negativo
Número de Explorações	100	8	24
Prevalência Aparente (%)	75,8	6	18,2
Willson (IC 95%)	67,8-82,3%	3,1-11,5%	12,5-25,6%

Tabela 7: Distribuição dos resultados dos testes ELISA por posto de recolha de leite e por concelho.

Local de Recolha de leite		+	±	-	Concelhos (n)	+	±	-
						n (%)	n (%)	n (%)
Posto Vinha brava		9		1	Angra do Heroísmo (82)	62 (75,6%)	4 (4,9%)	16 (19,5%)
Posto Feteira		5	1	2				
Posto Porto Judeu		1	1	2				
Posto São Sebastião		9		4				
Posto Paul		2		0				
Posto Altares		3		2				
Posto Raminho		3		0				
Posto Serreta		0	1	0				
Posto Doze Ribeiras		4		0				
Posto Santa Barbara		2		2				
Posto Cinco Ribeiras		4		0				
Posto São Bartolomeu		7		1				
Salas de ordenha	Angra do Heroísmo	13	1	2	Praia da Vitória (50)	38 (76%)	4 (8%)	8 (16%)
	Praia da Vitória	5	0	0				
Posto Fonte do Bastardo		3		1				
Posto Canada dos Pastos		2	1	0				
Posto Fontinhas		4		5				
Posto Lajes		9	2	1				
Posto Vila Nova		7		0				
Posto Agualva		4	1	0				
Posto Quatro Ribeira		2		0				
Posto Biscoitos		2		1				
Frequência absoluta		10 0	8	24				
Frequência relativa (%)		75, 8	6	18,2				

Na tabela 7 apresentam-se os resultados da titulação de anticorpos para *C. burnetii* obtidos pelo método ELISA, agrupados por posto de recolha de leite e por concelho. Nas salas de ordenha obteve-se um total de 18 explorações positivas, entre as quais 13 no concelho de Angra do Heroísmo e 5 na Praia da Vitória, apenas 1 exploração duvidosa e 2 negativas, todas elas localizadas no concelho de Angra. Também é possível observar na tabela 7 uma prevalência de *C. burnetii* bastante similar em ambos os concelhos.

Quando analisada a distribuição dos resultados serológicos em percentagem podemos concluir que em todos os postos, a percentagem de resultados positivos é superior aos negativos, à exceção dos postos do Porto Judeu e Fontinhas onde é inferior, do posto de Santa Barbara onde é equivalente e do posto da Serreta que apresentou apenas um

resultado duvidoso (tabela 8 e gráfico1). Os postos do Paul, Doze Ribeiras, Cinco Ribeiras, Quatro Ribeiras e Vila Nova apresentaram somente resultados positivos, no entanto não se observou qualquer posto apenas com resultados negativos.

Tabela 8: Distribuição dos resultados por local de recolha de leite (em %)

Posto de recolha de leite	% de resultados positivos	% de resultados duvidosos	% de resultados negativos
Vinha Brava	90	0	10
Feteira	62,5	12,5	25
Porto Judeu	25	25	50
São Sebastião	69	0	31
Paul	100	0	0
Altares	60	0	40
Raminho	100	0	0
Serreta	0	100	0
Doze Ribeiras	100	0	0
Santa Bárbara	50	0	50
Cinco Ribeira	100	0	0
São Bartolomeu	87,5	0	12,5
Salas de ordenha	85,5	5	9,5
Fonte Bastardo	75	0	25
C. dos pastos	66,7	33,3	0
Fontinhas	44,4	0	55,6
Lajes	75	8,3	16,7
Vila Nova	100	0	0
Agualva	80	20	0
Quatro Ribeiras	100	0	0
Biscoitos	66,7	0	33,3

As explorações sujeitas ao estudo de análise de pesquisa de anticorpos anti-*C. burneti*, apresentam-se distribuídas pelas diversas freguesias da ilha terceira, de acordo com a sua parcela de terreno principal.

Figura 5: Mapa referente à distribuição das explorações analisadas por freguesia na ilha Terceira.

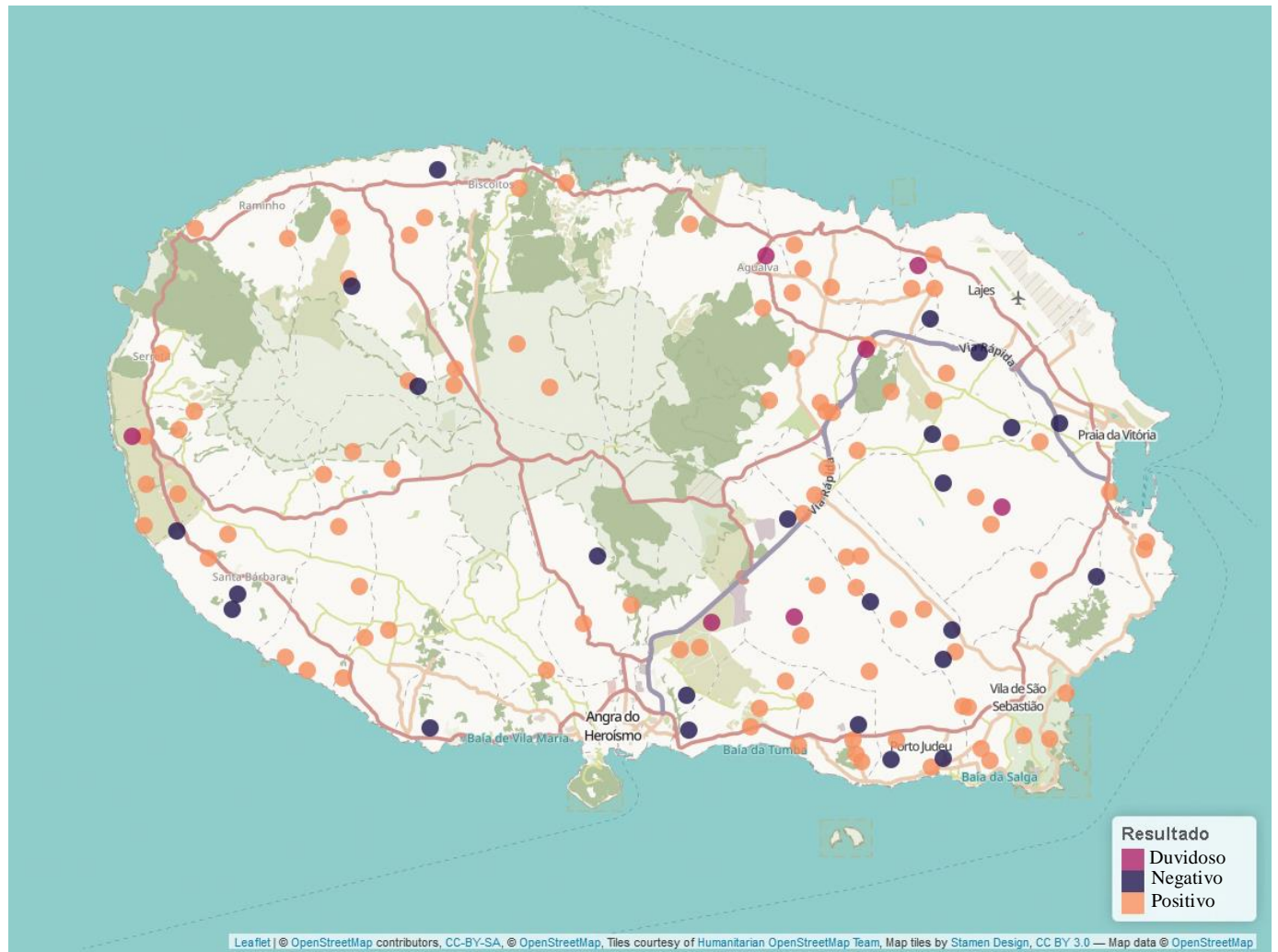
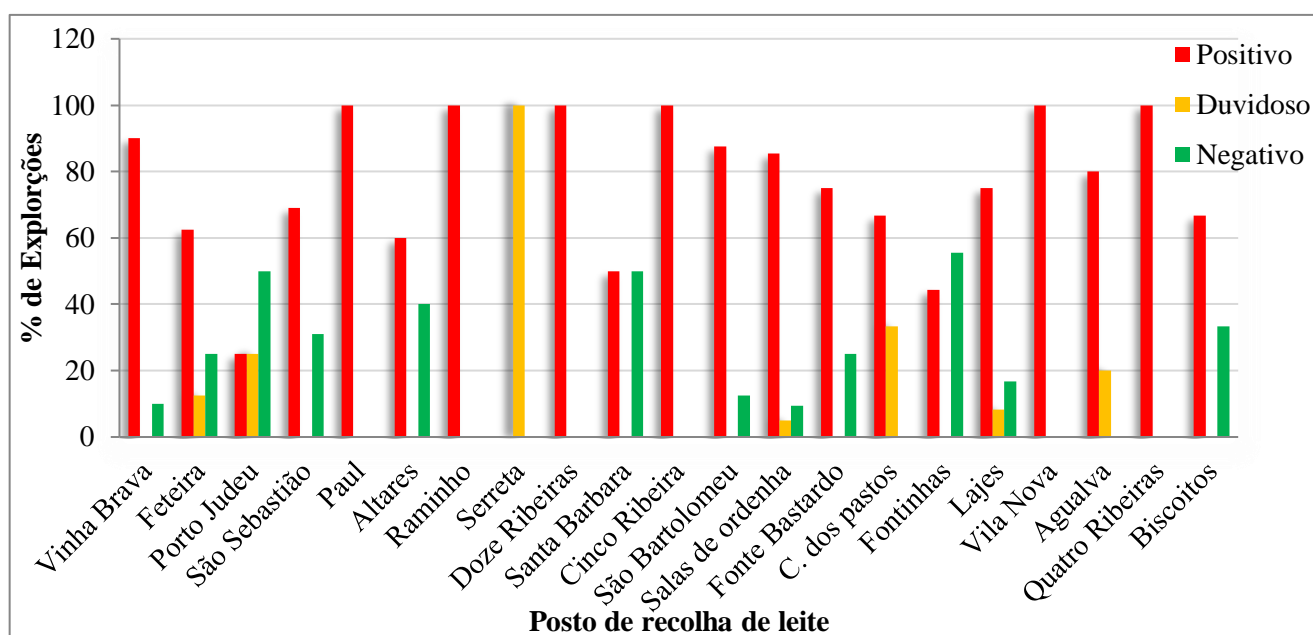


Gráfico 1: Percentagem dos resultados serológicos distribuídos por local de recolha de leite



6.2- Estudo 2- Fatores de risco associados à infeção por *C. burnetii*

De forma a avaliar uma eventual influência do tamanho da exploração nos resultados finais, recorreu-se ao teste qui-quadrado, no qual se relacionou os resultados da deteção de anticorpos anti-*C. burnetii* com o número de vacas leiteiras da exploração. Neste estudo, o tamanho da exploração mostrou influir nos resultados serológicos obtidos ($p < 0,05$) (tabela 9). Por outro lado, quando estudada a densidade (número de vacas por hectare) de cada exploração comparativamente com os resultados serológicos obtidos, como representado na tabela 10, não se observou uma relação estatisticamente significativa no teste qui-quadrado ($p > 0,05$).

Tabela 9: Distribuição dos resultados serológicos em função do tamanho da exploração

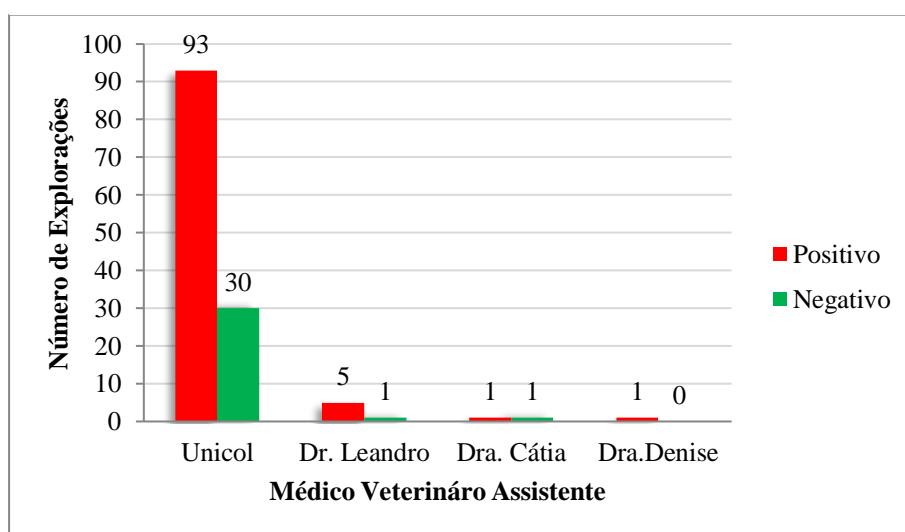
Resultado	Tamanho do rebanho (nº de vacas leiteiras)			
	<25 n (%)	25-50 n (%)	51-100 n (%)	>100 n (%)
-	16 (50%)	11 (34,4%)	4 (12,5%)	1 (3,1%)
+	25 (25%)	42 (42%)	28 (28%)	5 (5%)
Total	41 (31,1%)	53 (40,2%)	32 (24,2%)	6 (4,5%)
Valor de P	0,0499			

Tabela 10: Distribuição dos resultados serológicos considerando a densidade da exploração

Resultado	Densidade (n°vacas/ha)		
	<1,5 n (%)	1,5-2 n (%)	>2 n (%)
-	13 (40,6%)	12 (37,5%)	7 (21,9%)
+	30 (30%)	52 (52%)	18 (18%)
Total	43 (32,6%)	64 (48,5%)	25 (18,9%)
Valor de P	0,3406		

A análise das explorações positivas e negativas em função do seu médico veterinário assistente pode ser observada no gráfico 2. Este demonstra que apenas 9 das explorações estudadas não têm como veterinário assistente a UNICOL. Não se observou qualquer relação estatisticamente significativa entre a positividade da amostra e o veterinário assistente de cada exploração.

Gráfico 2: Distribuição das explorações positivas e negativas em função do Médico Veterinário assistente



Na tabela 11 estão representados os resultados do teste ELISA em função da aquisição ou compra de novos animais nos últimos 4 anos. Pode-se observar na tabela que a percentagem de explorações que adquiriram novos animais é bastante semelhante nas explorações negativas (53,1%) e positivas (54%), pelo que não foi observada qualquer relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tabela 11: Distribuição dos resultados serológicos considerando a aquisição/compra de novos animais

Resultados	Aquisição de novos animais	
	Não n (%)	Sim n (%)
-	15 (46,9%)	17 (53,1%)
+	46 (46%)	54 (54%)
Total	61 (46,2%)	71 (53,8%)
Valor de P	0,931	

O contacto dos animais das explorações analisadas com ovelhas ou cabras (16,7%) e com pilhas de estrume (18,9%) não demonstrou ser muito frequente, e apresentou valores estatisticamente similares nas explorações negativas e positivas para *C. burnetii* ($p > 0,05$). Por outro lado, em 50% das explorações analisadas observou-se o contacto de cães ou gatos com os bovinos e nestas explorações, a percentagem de resultados positivos (57%) foi bastante superior à das explorações negativas (28,1%). Esta superioridade demonstrou ter significado estatístico ($p=0,004$). Para além disso, em todas as explorações analisadas foi observado o contacto com bovinos de outras explorações (tabela 12).

Tabela 12: Distribuição dos resultados serológicos em função do contacto das explorações analisadas com ovelhas/cabras; cães/gatos; bovinos de outras explorações e pilhas de estrume.

Contacto das explorações com		Resultados		Total n (%)	Valor de p
		- n (%)	+ n (%)		
Ovelhas/ Cabras	Não	25 (78,1%)	85 (85%)	110 (83,3%)	0,364
	Sim	7 (21,9%)	15 (15%)	22 (16,7%)	
Cães/gatos	Não	23 (71,9%)	43 (43%)	66 (50%)	0,004
	Sim	9 (28,1%)	57 (57%)	66 (50%)	
Bovinos de outras explorações	Não	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	$0,325 \times 10^{-8}$
	Sim	32 (100%)	100 (100%)	132 (100%)	
Pilhas de estrume	Não	29 (90,6%)	78 (78%)	107 (81,1%)	0,113
	Sim	3 (9,4%)	22 (22%)	25 (18,9%)	

Na tabela 13 pode-se observar que o abeberamento dos animais nas explorações testadas é feito, preferencialmente, através de tanques móveis (73,5%) e tanques fixos (75,8%), ambos abastecidos por água da rede. No entanto nenhum destes métodos de abeberamento demonstrou ser estatisticamente significativo ($p > 0,05$). De todos os métodos analisados a utilização de bebedouros improvisados, apesar de pouco usual (7,6%) foi a única que evidenciou significância estatística ($p=0,048$).

Tabela 13: Distribuição dos resultados serológicos em função do método de abeberamento das explorações testadas.

Método de abeberamento		Resultados		Total n (%)	Valor de p
		- n (%)	+ n (%)		
Tanques móveis com água da rede	Não	10 (31,2%)	25 (25%)	35 (26,5%)	0,486
	Sim	22 (68,8%)	75 (75%)	97 (73,5%)	
Aparagem de água das pastagens/ tetos	Não	21 (65,6%)	63 (63%)	84 (63,6%)	0,788
	Sim	11 (34,4%)	37 (37%)	48 (36,4%)	
Tanques fixos com água da rede	Não	10 (31,2%)	22 (22%)	32 (24,2%)	0,288
	Sim	22 (68,8%)	78 (78%)	100 (75,8%)	
Bebedouros improvisados	Não	27 (84,4%)	95 (95%)	122 (92,4%)	0,048
	Sim	5 (15,6%)	5 (5%)	10 (7,6%)	
Lagoas/ Charcos	Não	28 (87,5%)	90 (90%)	118 (89,4%)	0,689
	Sim	4 (12,5)	10 (10%)	14 (10,6%)	

7-Discussão

A partir da análise dos resultados serológicos, obteve-se uma prevalência aparente de (75,8%), o que permitiu verificar que a maioria das explorações analisadas foi exposta a *C. burnetii*. Este resultado é semelhante ao obtido na Holanda (78,6%) (Muskens *et al.*, 2011). No entanto, esta prevalência é um pouco discrepante da obtida por Anastácio *et al.* (2016), num estudo na região centro de Portugal (45,9%) e relativamente superior à obtida no noroeste de Portugal (Pimenta *et al.*, 2015) e na região de Barcelos (Maia, 2017), 61,1 % e 62%, respetivamente. Comparativamente ao estudo de Anastácio *et al.* (2016) foram utilizadas diferentes metodologias e desenhos de estudo, uma vez que no referido estudo as explorações foram selecionadas com base nos distúrbios reprodutivos e não no total das explorações da região. Nos outros dois estudos a prevalência é ligeiramente inferior, no entanto é de salientar que nos últimos anos as explorações de bovinos leiteiros têm vindo a convergir para um sistema de estabulação, sendo no Norte mais expressivo. Contudo, é na região de Lisboa e na região Centro que se concentram os sistemas mais intensivos de produção de leite e onde a estabulação também assume um papel bastante importante. Pelo contrário, a sua expressão é mínima no Alentejo e nos Açores, pela utilização quase exclusiva de sistemas de pastoreio nestas duas regiões (Almeida & Silva, 2015). Em todas as explorações analisadas os animais permaneciam constantemente em regime de pastoreio à exceção de uma exploração onde permaneciam estabulados durante a noite. Segundo Tissot-Dupont *et al.* (1999) existe um maior risco de seropositividade quando os animais se encontram ao ar livre devido à maior facilidade no transporte de aerossóis contaminados entre explorações vizinhas (Tissot-Dupont *et al.*, 1999). Estas diferenças entre os sistemas produtivos utilizados em Portugal continental e Açores poderá estar relacionada com as discrepâncias dos resultados, no entanto esta relação deverá ser confirmada por trabalhos futuros na Região Autónoma dos Açores.

No que respeita à distribuição geográfica das explorações, verificou-se uma repartição bastante homogénea das explorações seropositivas por toda a ilha Terceira, obtendo-se uma prevalência no concelho de Angra do Heroísmo (75,6%) bastante similar à do concelho da Praia da Vitória (76%). Os postos do Paul, Doze Ribeiras, Cinco Ribeiras, Quatro Ribeiras e Vila Nova apresentaram somente resultados positivos, no entanto nenhum deles possui confrontação geográfica entre si. Por outro lado, obteve-se um total de 13 explorações seronegativas, nos postos da Feteira, Porto Judeu, São Sebastião e Fontinhas, os quais apresentam confrontação geográfica entre si. De todos os postos

analisados, o do Porto Judeu e das Fontinhas foram os únicos em que os resultados seronegativos superiorizaram os seropositivos.

De todas as variáveis estudadas as que demonstraram uma associação significativa com a positividade das amostras foram o tamanho do rebanho, o contacto dos bovinos com cães ou gatos, e o contacto com bovinos de outras explorações. O consumo de água dos animais através de bebedouros improvisados, apesar de pouco recorrente pareceu negativamente associado com a positividade da amostra.

Nos Açores as vacas adultas são normalmente exploradas em regime de pastoreio em pequenos “cerrados” cercados de muros de pedra basáltica, característicos dos Açores, que lhes determinam a área a pastorear em conjunto com as cercas elétricas (Amorim, 2008). Apesar de delimitarem a área das explorações, os muros basálticos não impedem a transmissão de *C. burnetti* por aerossóis, que é considerada o modo de transmissão mais importante de *C. burnetii*. Para além disso na maioria das explorações as pastagens são divididas em diversas parcelas afastadas umas das outras (Pimentel, 2011), o que implica a muda dos animais, que se deslocam a pé de uma parcela para outra, e onde muitas vezes contactam diretamente com bovinos de outras explorações. Visto que em nenhuma das explorações analisadas os animais se encontravam em estabulação permanente, todas elas foram consideradas como explorações abertas pois possibilitavam a comunicação com bovinos de outras explorações. Por estas razões, este deve ser considerado o principal factor de risco da disseminação da *C. burnetii* pelas explorações da ilha Terceira.

Segundo Anastácio *et al.* (2016) os rebanhos maiores são mais propensos a adquirir e desenvolver febre Q e o número de animais deve ser considerado um fator de risco para a disseminação de *C. burnetii*. O tamanho do rebanho foi significativamente associado à seropositividade das amostras, o que está de acordo com o estudo de Anastácio *et al.* (2016) bem como outros estudos (Ryan *et al.*, 2011; Agger *et al.*, 2013; Boroduske *et al.*, 2017). Através da observação dos resultados pode-se concluir que explorações com um efectivo superior a 50 animais estão relacionadas com uma maior taxa de seropositividade.

À semelhança das explorações de pequenos ruminantes onde podemos observar dois tipos de cães, os cães de guarda que têm a função de guardar o rebanho de possíveis predadores e os cães pastores que se ocupam da condução dos animais, na ilha Terceira é muito comum a presença de cães pastores essencialmente utilizados na condução de gado bovino leiteiro. Para além dos cães, algumas explorações têm gatos perto da

máquina ou salas de ordenha numa tentativa de combate aos roedores. Os resultados demonstraram que em 50% das explorações analisadas os bovinos contactavam diretamente com cães ou gatos e este fator demonstrou ter significado estatístico na seropositividade das amostras. Contudo o estudo realizado na Holanda em bovinos leiteiros (van Engelen *et al.*, 2014) e outros dois estudos em pequenos ruminantes, um na Holanda (Schimmer *et al.*, 2014) e outro noroeste de Itália (Rizzo *et al.*, 2016), não demonstraram uma associação significativa entre este factor (contacto com cães e gatos) e a positividade das explorações. No entanto segundo Maurin & Raoult (1999) os cães e gatos podem infetar-se pelo consumo de placentas ou leite de ruminantes infetados podendo assim representar um reservatório de *C. burnetii*. Por esta razão e devido à grande proximidade destes animais com os bovinos leiteiros este deve ser um fator a ter em conta da disseminação da febre Q.

Na ilha Terceira é cada vez menos frequente a presença de ovinos ou caprinos em conjunto com os bovinos leiteiros - das 132 explorações analisadas somente 22 tinham cabras ou ovelhas. Após a análise dos resultados observou-se que a presença de ovelhas ou cabras nos rebanhos analisados não interferiu significativamente com a seropositividade das explorações, o que está de acordo com o estudo realizado em vacas leiteiras do norte da Letónia (Boroduske *et al.*, 2017).

Estudos realizados no norte da Letónia e na Holanda (Agger *et al.*, 2013; Boroduske *et al.*, 2017) demonstraram que a aquisição de novos animais é um importante fator de risco para a disseminação de *C. burnetii* e que a quarentena é um método bastante eficaz na tentativa de contrabalançar este fator. No entanto este fator não apresentou significado estatístico no presente estudo, muito provavelmente devido à possibilidade de contacto e transmissão de aerossóis entre rebanhos vizinhos, não sendo necessário a introdução de novos animais na exploração para a introdução de novas doenças.

Nos produtos do parto é onde se encontra a maior concentração deste agente, no entanto *C. burnetii* também é excretada na urina, fezes e no leite dos animais infetados (Arricau-Bouvery & Rodolakis, 2005). Por esta razão, foi estudada a influência do contato dos animais com pilhas de estrume na seropositividade das amostras de BTM, no entanto, este fator não demonstrou significância estatística.

Coxiella burnetii é capaz de sobreviver até 30 meses em água corrente, no entanto o risco de transmissão de *C. burnetii* por inalação de aerossóis da água é muito baixo (Sales-Ortells & Medema, 2012). Neste estudo os principais métodos utilizados na distribuição de água aos animais não demonstraram uma relação significativa com os

resultados do teste ELISA, muito provavelmente porque a maioria dos produtores utilizava água da rede no abeberamento dos animais e tal como Sales-Ortells & Medema (2012) referiram, a probabilidade de transmissão de *C. burnetii* por inalação de aerossóis da água é bastante baixa. No entanto, a utilização de bebedouros improvisados, como por exemplo recipientes de plástico cortados, evidenciou uma relação negativa com a positividade das amostras. Isto deve-se muito provavelmente ao facto de apenas 10 das 132 explorações analisadas utilizarem este método e destas 10 explorações todas elas apresentarem um número de animais muito reduzido (inferior a 10). Deste modo, a relação indireta da utilização de bebedouros improvisados com a positividade da amostra poderá estar associada ao tamanho das explorações que têm por rotina a utilização deste método. Contudo, estudos futuros serão necessários para confirmar este resultado.

Uma vez conhecida a dimensão da doença na ilha Terceira e visto que as manifestações clínicas mais comumente observadas estão relacionadas com distúrbios reprodutivos (Guatteo, 2013), seria importante investigar o verdadeiro prejuízo económico destes distúrbios nas explorações positivas, de modo a compreender, se do ponto de vista económico, valerá ou não a pena optar por uma estratégia de vacinação.

Sendo uma doença de notificação obrigatória, e sabendo que não foram declarados casos de Febre Q em humanos na Região Autónoma dos Açores acreditamos que foi um passo importante para a sensibilização de possíveis casos em humanos que poderão estar subestimados e, consequentemente, subnotificados.

9-Limitações e Sugestões

Os resultados deste estudo apresentam algumas limitações, como é o caso da localização das explorações onde foi tido em conta apenas a parcela principal, desvalorizando as parcelas menores que por vezes se encontram distantes da principal. Seria pertinente, futuramente, desenvolver um estudo no qual se contabilizassem todas as parcelas da exploração e se determinasse qual o risco associado entre número de parcelas e a seropositividade das explorações quando testadas para *C. burnetii*. Para além disso foi coletada apenas uma amostra de BTM por exploração e todas elas no mês de janeiro, não sendo possível concluir a variação da seroprevalência da febre Q ao longo do ano, ou incluir o contributo de vacas secas na altura da colheita para a seroprevalência.

É de salientar que os bovinos em pastoreio estão constantemente em contacto com as fezes de outros animais, e estas permanecem na pastagem por longos períodos de tempo. Neste estudo os dejetos distribuídos ao longo das pastagens não foram englobados nas pilhas de estrume pelo que seria importante estudar até que ponto a permanência das fezes no solo não influenciará na disseminação da *C. burnetii* dentro da exploração. Para além disso e visto que o regime de pastoreio é predominante nos Açores seria interessante estudar a influência de fatores ambientais, tais como o vento, no transporte de aerossóis contaminados com *C. burnetii* entre explorações.

8-Conclusão

Conclui-se que a febre Q apresenta uma seroprevalência bastante elevada nas explorações de bovinos de leite da região e observou-se também uma distribuição uniforme dos casos positivos pelos dois concelhos da ilha Terceira. Mais estudos são necessários, na Região Autónoma dos Açores, para investigar o estatuto dos rebanhos e avaliar a prevalência da infeção nas diferentes ilhas. Esses dados serão cruciais para caracterizar a epidemiologia da infeção e decidir as estratégias de controlo mais adequadas a serem adotadas.

De todas as variáveis estudadas, o contacto dos animais com bovinos de explorações vizinhas parece ser o fator determinante na obtenção de uma prevalência tão elevada. Apesar de a vacinação não ser considerada eficaz na eliminação da bactéria em animais portadores, pode reduzir significativamente a excreção do agente e consequentemente a génese de novos infetados, pelo que é um fator a ter em conta na ilha Terceira.

O tamanho do rebanho também apresentou significância estatística e observou-se que os rebanhos superiores a 50 animais tem maior probabilidade de se contaminar e disseminar a doença dentro da exploração.

É ainda importante salientar que o contato dos bovinos leiteiros com cães ou gatos demonstrou ser um fator com influência na seropositividade das explorações. Apesar da utilidade destes animais nos rebanhos leiteiros terceirenses, os produtores deverão ter em conta o aumento do risco de introdução e disseminação da febre Q quando presentes na exploração.

Para além disso, estudos futuros serão necessários para verificar se os bebedouros improvisados apresentam realmente uma relação negativa com a positividade das amostras de BTM quando testadas para a presença de anticorpos contra *C. burnetii*.

Desta forma, a problemática da Febre Q deverá ser encarada numa perspetiva de sensibilização dos veterinários e produtores para que possam ser estabelecidas as estratégias de controlo mais adequadas.

10-Referências Bibliográficas

Agger, J.F., Paul, S., Christoffersen, A.B., Agerholm, J.S. (2013). Risk factors for *Coxiella burnetii* antibodies in bulk tank milk from Danish dairy herds. *Acta Vet. Scand.* 55, 80. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4176746/>

Almeida, B.A.S., Silva, E.L.D.G.S. (2015). A Eficiência das Explorações Leiteiras Micaelenses (Açores). *Rev. Econ. Sociol. Rural.* 53 (1), 129-142. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032015000600129

Amorim, D.N.S. (2008). *Azoto ureico no leite (AUL/MUN) uma ferramenta de gestão ambiental e nutricional- o caso de São Miguel*. Dissertação de mestrado em Ambiente Saúde e Segurança. Ponta Delgada: Universidade dos Açores- Departamento de Biologia.

Anastacio, S., Carolino, N., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G. J. (2016). Q Fever Dairy Herd Status Determination Based on Serological and Molecular Analysis of Bulk Tank Milk. *Transboundary and emerging diseases.* 63 (2), 293-300. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25208655>

Angelakis, E., Raoult, D., 2010: Q Fever. *Veterinary microbiology*, 140 (3-4), 297-309. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875249>

Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A. (2005). Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis?. *Veterinary research*, 36 (3), 327-349. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15845229>

Boroduske, A., Trofimova, J., Kibilds, J., Papule, U., Sergejeva, M., Rodze, I., Grantina-Ievina, L. (2017). *Coxiella burnetii* (Q fever) infection in dairy cattle and associated risk factors in Latvia. *Epidemiol Infect.* 145 (10), 2011-2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28462725>

Cabell, E. (2007). Bovine abortion: aetiology and investigations. *In Practice*, 29 (8), 455-463. <https://inpractice.bmj.com/content/29/8/455>

Cantas, H., Muwonge, A., Sareyyupoglu, B., Yardimci, H., Skjerve, E. (2011). Q fever abortions in ruminants and associated on-farm risk factors in northern Cyprus. *BMC Vet. Res.* 7 (13). <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-7-13>

Chmielewski, T., Tylewska-Wierzbanowska, S. (2012). Q Fever at the Turn of the Century. *Polish Journal of Microbiology.* 61 (2), 81–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23163207>

Cox, H.R. (1941). Cultivation of rickettsiae of the rocky mountain spotted fever, typhus and Q fever groups in the embryonic tissues of developing chicks. *Science.* 94 (2444), 399–403. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17798222>

Fournier, P-E., Marrie, T.J., Raoult, D. (1998). Diagnosis of Q Fever. *Journal of Clinical Microbiology.* 36 (7), 1823-1834. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC104936/>

Freitas, M.A.C. (2013). *Febre Q em bovinos*. Relatório final de estágio do mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Porto: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar-Universidade do Porto.

Guatteo, R., Beaudeau, F., Berri, M., Rodolakis, A., Joly, A., Seegers, H. (2006). Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Veterinary research.* 37 (6), 827-833. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973121>

Guatteo R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F. (2008) Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C.burnetii* inactivated vaccine. *Vaccine*, 26 (34), 4320-4328. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18586060>

Guatteo, R., Seegers, H., Taurel, A. F., Joly, A., Beaudeau, F. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* in domestic ruminants: a critical review. *Vet. Microbiol.* 149 (1-2), 1–16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115308>

- Guatteo, R. (2013). *Q Fever an emerging disease*. Servet Editorial.
- Givens, M.D., Marley, M.S.D. (2008). Infectious causes of embryonic and fetal mortality. *Theriogenology*. 70 (3), 270-285.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18502494>.
- Hilbink, F., Penrose, M., Kovacova, E., Kazar, J. (1993). Q fever is absent from New Zealand. *Int. J. Epidemiol.* 22 (5), 945–949.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8282477>
- Hubálek, Z., Rudolf, I. (2011). *Microbial Zoonoses and Sapronoses*. Springer Dordrecht Heidelberg London New York. 219-221
- Lampreia, J.T.B.F. (2010). *Seroprevalência de febre q em bovinos de carne na região do baixo Alentejo*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias-Departamento de Medicina Veterinária.
- Maia, N.E.S. (2017). *Febre Q em bovinos de leite: análise da situação em 5 explorações do Concelho de Barcelos*. Dissertação de mestrado integrado em Medicina Veterinária. Trás-os-Montes e Alto Douro: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Maurin, M., Raoult, D. (1999). Q fever. *Clinical microbiology reviews*, 12, 518-553.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515901>
- Muskens, J., van Engelen, E., van Mannen, C., Bartels, C., Lam T.J.G.M. (2111). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in Dutch dairy herds based on testing bulk tank milk and individual samples by PCR and ELISA. *Vet Rec.* 168 (3).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257587>
- Naing, L., Winn, T., Rusli, B.N. (2006). Practical Issues in Calculating the Sample Size for Prevalence Studies. *Archives of Orofacial Sciences*. 1, 9-14

Núncio, M.S., Alves, M.J. (2014). *Doenças associadas a artrópodes vetores e roedores*. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP. Lisboa. 121-125.

OIE. (2018). Q fever. *Terrestrial Manual 2018, chapter 2.1.16*.

Oyston, P.C.F., Davies C. (2011). Q fever: the neglected biothreat agente. *Journal of Medical Microbiology*. 60 (1), 9–21. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030501>

Palmela, C., Badura, R., Valadas, E. (2012). Acute Q fever in Portugal. Epidemiological and clinical features of 32 hospitalized patients. *Germes*. 2, 43-59. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3882866/>

Paul, S., Agger, J.F., Markussen, B., Christoffersen, A-B., Agerholm, J.S. (2012). Factors associated with *Coxiella burnetii* antibody positivity in Danish dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*. 107, 57–64. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587712001717>

Parreira, P.A.V. (2008). “*Estudo da prevalência de anticorpos anti – Coxiella burnetii numa amostra de dadores de sangue de uma região portuguesa*”. Dissertação de Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes (3ª Edição). Lisboa: Universidade de Lisboa- Faculdade de Medicina de Lisboa.

Pimentel, P.M.S. (2011). *Azoto ureico no leite (AUL/MUN) uma ferramenta de gestão da qualidade*. Dissertação de mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Angra do Heroísmo: Universidade dos Açores- Departamento de Ciências Agrárias.

Pimenta, L., Alegria, N., Anastacio, S., Sidi-Boumedine, K., da Silva, G., Rabico, A., Simoes, J. (2015). Prevalence of *Coxiella burnetii* antibodies in Portuguese dairy cattle herds. *Tropical animal health and production*. 47, 227-230. <https://europepmc.org/abstract/med/25339430>

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. (2004) *Microbiology*. 7th edition. McGRAWHill. 964.

Rizzo, F., Vitale, N., Ballardini, M., Borromeo, V., Luzzago, C., Chiavacci, L., Mandola, M.L. (2016). Q fever seroprevalence and risk factors in sheep and goats in northwest Italy, *Prev. Vet. Med.* 130, 10–17.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27435642>

Raoult, D., Marrie, T., Mege, J. (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet infect.* 5, 219-226. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15792739>

Ryan, E.D., Kirby, M., Collins, D.M., Sayers, R., Mee, J.F., Clegg, T. (2011). Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiology and Infection.* 139, 1413–1417.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073765>

Rodolakis, A., Berri, M., Hechard, C., Caudron, C., Souriau, A., Bodier, C. C., Blanchard, B., Camuset, P., Devillechaise, P., Natorp, J. C., Vadet, J. P., Arricau Bouvery, N. (2007). Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *Journal of dairy science.* 90 (12), 5352-5360.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024725>

Sales-Ortells, H., Medema, G. (2012). Screening-Level Risk Assessment of *Coxiella burnetii* (Q Fever) Transmission via Aeration of Drinking Water. *Environ. Sci. Technol.* 46 (7), 4125–4133. <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es203744g>

Santos, A., Bacellar, F., França A. (2007). Febre Q: Revisão de conceitos. *Medicina Interna,* 14 (2), 90-99.

https://www.researchgate.net/publication/283970810_Febre_Q_Revisao_de_conceito
[s](https://www.researchgate.net/publication/283970810_Febre_Q_Revisao_de_conceito)

Santos, A.S. (2016). Febre Q: do diagnóstico à investigação ecoepidemiológica de *Coxiella burnetii* no contexto da infeção humana. *Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Artigos breves* nº 5, 20-25. <http://www.insa.min-saude.pt/artigo-febre-q-do-diagnostico-a-investigacao-ecoepidemiologica-de-coxiella/>

Schmeer N., Müller P., Langel J., Krauss H., Frost J.W., Wieda J., (1987). Q fever vaccines for animals, *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol. Hyg. A* 267 (1), 79–88.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3324574>

Schimmer, B., de Lange, M.M.A., Hautvast, J.L.A., Vellema, P., van Duynhoven, Y.T.H.P. (2014). *Coxiella burnetii* seroprevalence and risk factors on commercial sheep farms in The Netherlands. *Veterinary Record*. 175 (1).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24789854>

Stilwell, G. (2013). *Clínica de Bovinos*. Publicações Ciência & Vida- Bayer. 229-230

Szymańska-Czerwińska, M., Niemczuk, K., Mitura, A. (2014). Prevalence of *Coxiella burnetii* in dairy herds- diagnostic methods and risk to humans- a review. *Bull Vet Inst Pulawy*. 58, 337-340. <https://content.sciendo.com/view/journals/bvip/58/3/article-p337.xml>

Tissot-Dupont, H., Torres, S., Nezri, M., Raoult, D., (1999). Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. *American journal of epidemiology*. 150, 67-74.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400556>

van Engelen, E., Schotten, N., Schimmer, B., Hautvast, J. L, van Schaik, G., van Duijnhoven, Y. T. (2014). Prevalence and risk factors for *Coxiella burnetii* (Q fever) in Dutch dairy cattle herds based on bulk tank milk testing. *Preventive veterinary medicine*. 117, 103-109. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25239684>

Van Metre, D. (2014). Q Fever. *Colorado State University Extension*. 5/10.

Woldehiwet, Z. (2004). Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis. *Res Vet Sci*. 77, 93–100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196898>

11-Anexos

Anexo 1- Questionário

Febre Q - Questionário

Nº Amostra	
Data colheita	

Colocar o número da amostra marcada na etiqueta enviada em anexo

Identificação

Proprietário da Exploração

Nome	
Telemóvel\Telefone	
Email	
Morada	
Região da exploração	
Código da exploração	

Médico Veterinário Assistente (assinale com x)

Unicol	
Sem Médico Veterinário assistente	
Outro (caso escolha esta opção, por favor indique o nome e o respectivo contacto)	
Nome	
Telemóvel	

Dados da exploração

Tamanho da exploração (assinalar com x)

Nº Vacas a dar leite	<20	
	20-40	
	41-60	
	61-80	
	81-100	
	101-130	
	131-160	
	161-200	
>200		

Produção leiteira média

(Kg/vaca aos 305 dias)

Saúde do úbere (assinale com x)

CCS	(<100)×10 ³	
	(100-200)×10 ³	
	(201-300)×10 ³	
	(301-400)×10 ³	
	(>400)×10 ³	

Área da exploração (assinalar com x)

Área da exploração em alqueires dedicada às vacas de leite	<50	
	50-100	
	101-150	
	151-200	
	201-250	
	251-300	
	301-350	
	351-400	
	401-500	
	501-600	
	601-700	
	>700	

Mastites Clínicas (assinale com x)

Raramente (média <1/mês)	
1-5/mês	
6-12/mês	
13-20/mês	
>20/mês	

Nº de serviços/ concepção

(Nº de IA's ou cobrições naturais que resultam em concepção)

Estabulação	Total	Parcial	Inexistente
(assinale com x)			

Questionário continua no verso.

Controlo reprodutivo (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Saúde Uterina (assinale com x)

	0-1%	2-5%	6-15%	>15%
Retenção placentária	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Endometrite/Metrite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Abortos

(assinale com x)

0-1%	2-5%	6-15%	>15%
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Entrega dos abortos no laboratório

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

(Em caso afirmativo, identifique as causas abaixo)

Causas identificadas de aborto: _____

Vitelos fracos ao nascimento

(assinale com x)

0-1%	2-5%	6-15%	>15%
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Vacas em contacto com cães ou gatos: (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Vacas em contacto com ovelhas: (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Vacas em contacto com bovinos de outras explorações

(assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Vacas em contacto com pilhas de estrume: (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Abeberamento das Vacas: (assinale com x)

	Sim	Não
Cisternas móveis, com bebedouro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tanques de cimento, abastecidos por água das pastagens/tetos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tanques de cimento, abastecidos por auto-tanques/ água da rede	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Bebedouros improvisados (arcas frigoríficas, bidões, etc.)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lagoas ou Charcos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Pneumonias (no primeiro mês pós-parto): (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Importação/Compra de animais nos últimos 4 anos: (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Já tinha ouvido falar de Febre Q (Coxiella burnetti): (assinale com x)

Sim	<input type="checkbox"/>	Não	<input type="checkbox"/>
------------	--------------------------	------------	--------------------------

Em caso afirmativo forneça alguns detalhes: _____

Em caso de dúvidas contacte:

Rodrigo Rodrigues: 961857293

OBRIGADO PELA SUA COLABORAÇÃO!